

ゲノム安定性維持に関与するRecQL5ヘリカーゼの DNA修復機構における機能の解析

著者	細野 嘉史
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15783号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58780

ゲノム安定性維持に関与する RecQL5 ヘリカーゼの
DNA 修復機構における機能の解析

東北大学大学院薬学研究科 博士課程後期
生命薬学専攻 遺伝子制御薬学分野
細野 嘉史

本論文は以下の原著論文を基とした博士号学位論文である。

【主要論文】

1) The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis

Yoshifumi Hosono, Takuya Abe, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Takemi Enomoto, Masayuki Seki

Biochemical and Biophysical Research Communications, **410**, 568-573, 2011

2) Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents

Yoshifumi Hosono, Takuya Abe, Masamichi Ishiai, M. Nurul Islam, Hiroshi Arakawa, Weidong Wang, Shunichi Takeda, Yutaka Ishii, Minoru Takata, Masayuki Seki, Takemi Enomoto

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2014 (in press)

3) Function of Tipin in Defensive Mechanism against Topoisomerase I Inhibitor

Yoshifumi Hosono, Takuya Abe, Masato Higuchi, Kosa Kajii, Shuichi Sakuraba, Shusuke Tada, Takemi Enomoto, Masayuki Seki

The Journal of Biological Chemistry, 2014 (in press)

【参考論文】

1) KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation

Takuya Abe, Masamichi Ishiai, Yoshifumi Hosono, Akari Yoshimura, Shusuke Tada, Noritaka Adachi, Hideki Koyama, Minoru Takata, Shunichi Takeda, Takemi Enomoto, Masayuki Seki

Cellular Signalling, **20**, 1978-1985, 2008

2) The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. Role of the N-terminal region of RECQL4 in cells

Takuya Abe, Akari Yoshimura, Yoshifumi Hosono, Shusuke Tada, Masayuki Seki, Takemi Enomoto

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, **1813**, 473-479, 2011

3) The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates

Takuya Abe, Kazuto Sugimura, Yoshifumi Hosono, Yasunari Takami, Motomu Akita, Akari Yoshimura, Shusuke Tada, Tatsuo Nakayama, Hiromu Murofushi, Katsuzumi Okumura, Shunichi Takeda, Masami Horikoshi, Masayuki Seki, Takemi Enomoto

The Journal of Biological Chemistry, **286**, 30504-30512, 2011

4) Functional relationship between Claspin and Rad17

Akari Yoshimura, Motomu Akita, Yoshifumi Hosono, Takuya Abe, Masahiko Kobayashi, Ken-ichi Yamamoto, Shusuke Tada, Masayuki Seki, Takemi Enomoto

Biochemical and Biophysical Research Communications, **414**, 298-303, 2011

目次

要旨	8
第1章 緒言	12
第1節 本研究の背景	
第2節 真核生物の DNA 複製機構	
第3節 真核生物の DNA 修復機構	
第4節 ニワトリ B リンパ細胞由来 DT40 細胞とその実験系	
第5節 本研究の目的	
第2章 DNA ヘリカーゼ RecQL5 の ICL 修復における機能の解析	23
第1節 序論	
第1項 RecQ ヘリカーゼファミリー	
第2項 RecQL5	
第3項 ファンconi貧血とその原因遺伝子	
第4項 ICL 修復	
第2節 結果	
第1項 RecQL5 の ICL 修復への関与	
第2項 ファンconi貧血経路との関連	
第3項 複製チェックポイント機構との関連	
第4項 相同組換え修復経路との関連 1・BRCA2・	
第5項 相同組換え修復経路との関連 2・Rad51・	
第6項 相同組換え修復経路との関連 3・Rad54・	
第7項 免疫グロブリン遺伝子座における組換え	

第3節 考察

第3章 複製フォーク複合体構成因子 Tipin のカンプトテシン毒性防御機構における機能の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

第1節 序論

- 第1項 複製フォーク複合体・DNA複製の必須因子と非必須因子
- 第2項 Top1 とその阻害剤
- 第3項 *TIPIN* 遺伝子破壊株の CPT 高感受性

第2節 結果

- 第1項 CPT 処理時の DSB 末端の露出
- 第2項 CPT 処理時の DNA 損傷応答
- 第3項 CPT 処理時の Top1 の挙動
- 第4項 CPT 存在下における DNA 合成
- 第5項 CPT 存在下における DNA 複製フォークの進行

第3節 考察

第4章 SNMヌクレアーゼのエトポシド誘導性アポトーシスへの関与の検討・65

第1節 序論

- 第1項 DNA 損傷により誘導されるアポトーシス
- 第2項 DSB 誘導性アポトーシスの実行因子
- 第3項 SNMヌクレアーゼファミリー

第2節 結果

- 第1項 SNMヌクレアーゼのエトポシド誘導性アポトーシスへの関与
- 第2項 SNMヌクレアーゼ三重破壊株を用いた解析

第3節 考察

第 5 章	本研究全体の総括	73
第 6 章	実験材料および方法	75
第 1 節	細胞培養 (使用株一覧)	
第 2 節	遺伝子破壊株および発現株の作製 (使用薬剤一覧、使用プライマー一覧)	
第 3 節	フローサイトメトリーを用いた細胞数の計測	
第 4 節	フローサイトメトリーを用いた死細胞の検出	
第 5 節	フローサイトメトリーを用いた細胞周期分布の解析	
第 6 節	ギムザ染色による染色体異常の検出	
第 7 節	ウェスタンブロッティング (使用抗体一覧)	
第 8 節	Ig diversification assay	
第 9 節	姉妹染色分体交換 (SCE) の検出	
第 10 節	細胞免疫染色	
第 11 節	DNA fiber assay	
第 12 節	細胞成分分画	
第 13 節	MTT assay	
第 14 節	TUNEL assay	
第 15 節	ミトコンドリア膜電位変化の検出	
謝辞		90
引用文献		92

要旨

本研究では、”DNA 修復に関与する RecQL5”、”DNA 複製に関与する Tipin”、”DNA 修復およびテロメア維持などに関与する SNM スクレアーゼファミリー”という 3 つの因子について、シスプラチン、カンプトテシン、エトポシドなどの抗がん作用を持つ DNA 損傷剤を用いてそれぞれのゲノム安定性維持機構における新規機能について解析した。

1. RecQL5 による DNA クロスリンク損傷誘導性組換えの制御機構の解析

RecQ ヘリカーゼファミリーは大腸菌 RecQ と高い相同性を持つヘリカーゼであり、ヒトでは 5 つ存在する。その一つである RecQL5/Recql5 を欠損したマウスは高発がん性を示すことが報告されており、RecQL5 にはがん抑制因子としての機能が予想されている。しかし、RecQL5 の細胞内における詳細な分子機能は不明な点が多い。我々は、*RECQL5* 遺伝子破壊細胞が DNA クロスリンク剤であるシスプラチン(CDDP)およびマイトマイシン C (MMC)に特異的に高感受性を示すことを発見した。DNA クロスリンク損傷は複数の DNA 修復経路が協調的に働いて修復される。二重遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析および損傷シグナル応答の解析により、RecQL5 は”Rad17 らの関わる複製チェックポイント”および”FANCD2、FANCC らの関わるファンconi貧血経路”とは異なる形で DNA 鎖間クロスリンク(ICL)修復に関与することが示唆された。一方、*RECQL5/BRCA2* 二重遺伝子破壊株は *BRCA2* 単独破壊株と同程度の CDDP 感受性を示し、RecQL5 は BRCA2 に依存した相同組換え経路において機能することが示唆された。BRCA2 は相同組換えに必須の中間体である Rad51 フィラメントの形成に必要なタンパク質であり、細胞内での Rad51 フォーカスの形成にも必要とされる。*RECQL5* 破壊株において、MMC 処理後に Rad51 フォーカスの滞留が観察された。さらに、RecQL5 と Rad51 の結合が ICL 修復の促進に重要であった。同様に、RecQL5 の ATPase 活性もまた ICL 修復に寄与する。試験管内において RecQL5 が Rad51 フィラメントを除去する活性を持つこと、および Rad51 との結合活性および ATPase 活性がこの生化学的活性に必要という報告と合

せると、RecQL5は細胞内において Rad51 を DNA 上から除去し、不適切な組換え反応を抑制することを介して ICL 修復を促進する可能性が示唆された。実際に、姉妹染色分体交換および免疫グロブリン遺伝子座での組換え頻度を測定したところ、*RECQL5* 破壊株では CDDP 処理時の組換え頻度が亢進していた。さらに、免疫グロブリン遺伝子座の特性を利用して、相同組換えの鋳型となる偽 V 遺伝子の配列を解析したところ、*RECQL5* 破壊株では CDDP 処理時の組換えの多様性もまた増加していた。これらの結果より、RecQL5 は DNA クロスリンク損傷に応答して機能し、相同組換えの過程で組換えの頻度と正確性を適切に制御していると考えられる(**Fig.1**)。Rad51 フィラメントはクロマチンリモデリング因子である Rad54 の活性により相同鎖へ侵入するが、侵入後の Rad51 フィラメントおよび不要となった Rad51 フィラメントは速やかに除去される必要がある。RecQL5 はこれらの Rad51 フィラメントを除去することで、ICL 修復を促進し、ゲノム安定性維持に寄与すると考えられる。一方、RecQL5 の欠損時には Rad51 フィラメントが残存し、不適切な組換え中間体の形成や不適切な鋳型との組換えが誘導されることが考えられる。

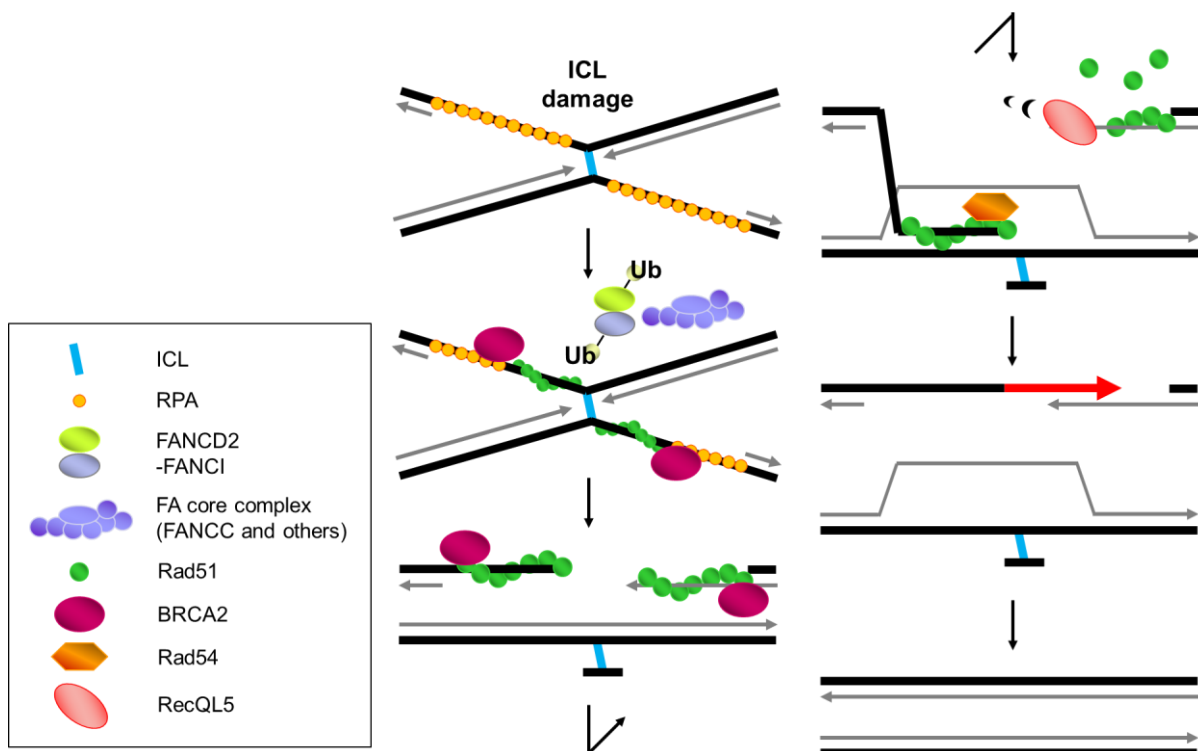


Fig. 1 Model of ICL repair including RecQL5.

2. Tipin によるカンプトテシン誘導性 DNA 複製障害の回避機構の解析

抗がん剤の一つであるカンプトテシン(CPT)はトポイソメラーゼ I (Top1)の阻害剤であり、Top1 の酵素活性を阻害するとともに Top1 をクロマチン上に滞留させ、複製フォークとの衝突で DNA 二本鎖切断(DSB)末端を産生することで細胞毒性を発揮する。CPT による DNA 複製障害を複製フォークがいかにして回避するのかに関しては、未だ不明な点が多い。我々は、複製フォークの構成因子の一つである Tipin に着目し、複製フォークの障害回避機構に関して解析した。TIPIN 破壊株は CPT に著しい感受性を示し、DSB 末端の指標である H2AX のリン酸化が亢進した。その感受性の原因は、相同組換え修復経路や複製チェックポイント経路の欠損とは異なっていた。一方、TIPIN 破壊株では CPT 存在下における複製フォークの進行距離の低下が観察された。CPT 処理時の Top1 の挙動を観察したところ、TIPIN 破壊株では野生株では生じないプロテアソーム依存的な分解を受けている可能性が示唆された。CPT 感受性および Top1 の分解は、複製フォークの進行を停止させる薬剤であるアフィディコリンの前処理で部分的に抑制された。Top1 の分解は複製フォークとの衝突で生じ得るという報告を考慮すると、Tipin は複製フォークと Top1 のクロマチン上での衝突を防いでいる可能性が考えられる

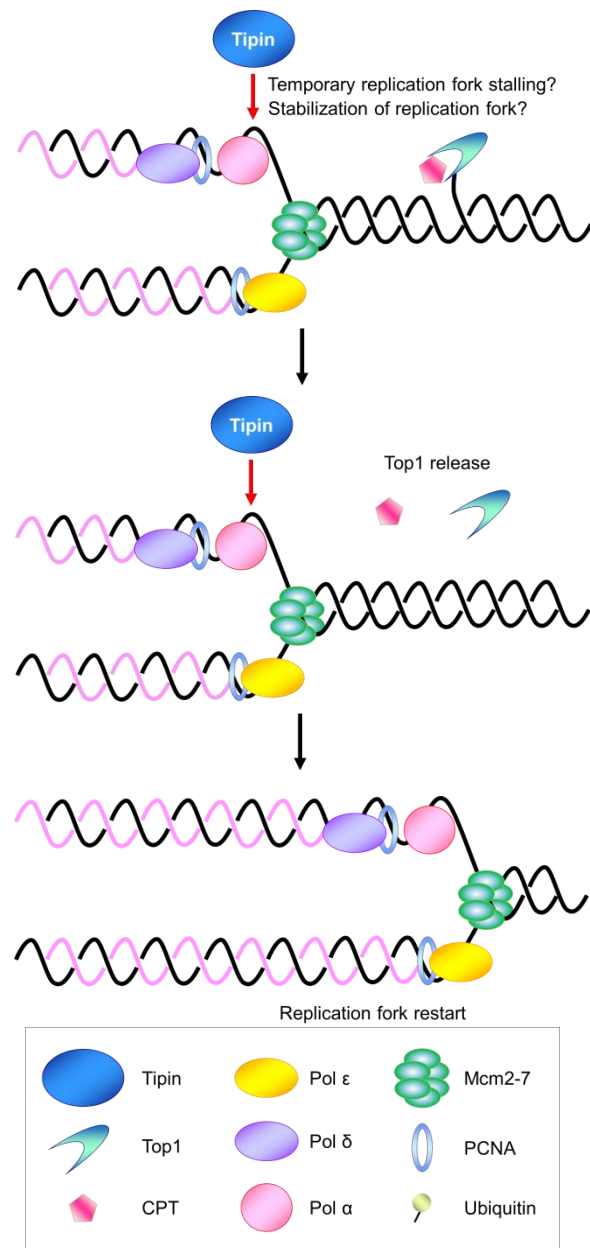


Fig. 2 Model of Tipin-mediated protection of the replication fork following CPT treatment.

(Fig.2)。Tipin を欠損した複製フォークは CPT 処理時に DSB 末端を高頻度で産生し、複製フォークの崩壊を招いてそれ以上の進行が不可能になると考えられる。

3. SNM ファミリーのエトポシド誘導性アポトーシスへの関与の検討

トポイソメラーゼ II (Top2)は DNA に DSB を導入し、DNA 二本鎖同士の絡まりを解消したのち再結合させるという酵素活性を持つ。Top2 の阻害剤であるエトポシドは、Top2 が導入した DSB の再結合過程を阻害することで細胞毒性を発揮し、細胞にアポトーシスを誘導する。DNA 損傷によるアポトーシスでは、DNA に結合する因子が損傷を感知してアポトーシスの実行シグナルを出すと考えられるが、それを担う因子や分子機構については解析が不十分であった。我々は本研究において、SNM ヌクレアーゼファミリーに属する SNM1A、Apollo/SNM1B、Artemis/SNM1C の 3 つがエトポシド誘導性アポトーシスに関与することを示した。これらの遺伝子の三重破壊株を作製し解析したところ、完全なアポトーシスの抑制は見られなかったものの、アポトーシスにおける DNA 断片化の相加的な減弱が観察された。以上の結果は、SNM ヌクレアーゼのすべてがエトポシド誘導性アポトーシスの実行に部分的に関与し、DNA 断片化において協調的にはたらく可能性を示唆している。

References

1. Hosono, *et al.*, Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2014 (in press)
2. Hosono, *et al.*, Function of Tipin in Defensive Mechanism against Topoisomerase I Inhibitor, *The Journal of Biological Chemistry*, 2014 (in press)
3. Hosono, *et al.*, The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **410**, 568-573, 2011

第 1 章 諸言

第 1 節 本研究の背景

遺伝情報は正確に複製され安定に継承される必要があり、DNA が損傷を受けた場合は適切に修復されねばならない。ゲノム安定性維持や DNA 複製・修復の機構が破綻すると、細胞のがん化や早期老化を引き起こす恐れがある(Auerbach and Verlander 1997; Branzei and Foiani 2008; Branzei and Foiani 2010; Lambert and Carr 2013)。実際に、発がん・早期老化を主症状とする遺伝性疾患の多くが、DNA 複製・修復に関与する因子を原因遺伝子としている。近年、分子生物学的手法の目覚ましい発展によりゲノム安定性維持機構の研究は飛躍的に進んだものの、依然として未解決な部分も多く残されている。第一に、関与する多くの因子の同定がなされたが、個々の因子の詳細な機能は未だわかっていない。第二に、酵母や線虫を用いた研究で機能解析が進んだ遺伝子であっても、高等真核生物において機能が保存されているかは未知数である。第三に、DNA 複製・修復機構を試験管内で完全に再構成することは非常に難しく、またその遺伝子欠損の多くが細胞の増殖能や個体の生殖能に影響を与えるために逆遺伝学的な解析も簡単ではないことが挙げられる。これらの課題を乗り越え、DNA 複製・修復の分子機構の全貌を解明することが望まれる。

本研究においては、第 2 章では DNA ヘリカーゼ RecQL5 の DNA クロスリンク損傷における機能、第 3 章では複製フォーク複合体構成因子 Tipin の新たな役割、第 4 章では SNM スクレアーゼファミリーのエトポシド誘導性アポトーシスにおける関与の可能性についてそれぞれ解析し、ゲノム安定性維持機構の研究で未解明の領域に挑戦した。

本章では、第 2～3 節で第 2～4 章を理解するための背景を概説し、さらに第 4 節で第 2～4 章における共通の実験材料であるニワトリ DT40 細胞について紹介する。本章最後の第 5 節で本研究の目的を述べる。

第2節 真核生物の DNA 複製機構

細胞分裂時、細胞は DNA 複製により自らの DNA を鋳型として完全に相同な DNA を2つ作る必要がある。DNA 複製は適切な時期に適切な回数だけ行われるように厳密に制御されているが、その制御機構の破綻は遺伝情報の継承に不具合を引き起こし、細胞のがん化や老化を誘引する原因となる。

真核細胞の DNA 複製機構に関する研究は近年飛躍的に進展した。これまでに明らかにされている DNA 複製機構を概説する(Branzei and Foiani 2010; Errico and Costanzo 2010; Lambert and Carr 2013)。DNA 複製開始に先立ち複製開始点にライセンス化因子を含む一群のタンパク質が集合し、複製前複合体 (pre-replicative complex: pre-RC) を形成する。続いて、pre-RC に含まれる MCM2-7 (minichromosome maintenance 2 to 7) 複合体を標的として Cdc45 や GINS など様々なタンパク質が結合し、同時に MCM2-7 複合体自体にも構造的な変化をもたらすことで、複製開始前複合体 (pre-initiation complex: pre-IC) へと移行する。この pre-IC への移行の過程にはサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase: CDK) や Cdc7 によるタンパク質のリン酸化が必要である。pre-IC 中の MCM2-7 複合体は DNA ヘリカーゼ活性を保持しており、DNA 二本鎖を巻き戻しながら一本鎖 DNA 上を移動すると考えられている。ヘリカーゼによって露出した親鎖の一本鎖 DNA を鋳型とし、DNA ポリメラーゼ群による新生 DNA 鎖の合成が起こる。この際、リーディング鎖では DNA polymerase ϵ (Pol ϵ)による連続的な合成、ラギング鎖では DNA polymerase α (Pol α)および DNA polymerase δ (Pol δ)を中心とした不連続合成が行われる。Pol α は、保持するプライマーゼ活性により RNA プライマーを合成し、それらを起点として Pol δ により比較的長い新生 DNA 鎖が合成される。それぞれ不連続に合成された岡崎フラグメントは、DNA リガーゼの一つである Ligase III により連結され、不要な部分は FEN1 などの DNA ヌクレアーゼにより除去される。

第3節 真核生物の DNA 修復機構

本節では数ある DNA 修復機構のうち、本論文全体に関係が深い DNA 二本鎖切断(DNA

double strand break; DSB)修復、および重要なゲノム安定性維持機構である複製チェックポイントについて概説し、それ以外の修復機構に関しては各章(第 2～4 章)の序論にて解説する。DNA 損傷や複製ストレスを誘導する薬剤として様々な化学物質が知られているが、本研究で用いた DNA 損傷剤については **Table. 1-1** にまとめた。

Table.1-1 The list of DNA-damaging agents.

Names	Action mechanisms	Major DNA repair pathway
Camptothecin (CPT)	Topoisomerase I inhibition	HR
Etoposide (Eto)	Topoisomerase II inhibition	NHEJ
Cisplatin (CDDP)	DNA crosslink	FA, HR, TLS(, NER)
Mitomycin C (MMC)	DNA crosslink	FA, HR, TLS(, NER)
Hydroxyurea (HU)	dNTP pool depletion	(HR)
Aphidicolin (APH)	DNA polymerase inhibition	(HR)
Olaparib	PARP inhibition	HR
Methyl methansulfonate (MMS)	DNA alkylation	BER, HR

HR; homologous recombination, NHEJ; non-homologous end joining, FA; Fanconi anemia (pathway), TLS; translesion synthesis, NER; nucleotide excision repair, BER; base excision repair.

1.3.1 DSB 修復機構

DSB は二重らせんを巻いた DNA の両方の鎖が切断される損傷であり、数ある DNA 傷害の中でも最も重篤な損傷である(Chu 1997; Kanaar et al. 1998)。DSB が生じた細胞はチェックポイントと呼ばれる DNA 損傷応答機構を活性化して細胞周期の進行を遅延させ、DNA 損傷の修復を行う(Branzei and Foiani 2008; Finn et al. 2012)。一定時間以内に“すべての” DSB が修復できず、染色体 DNA 上に DSB が一つでも残った場合、細胞はアポトーシスにより死滅する。

真核生物において DSB を修復する主要な機構として、相同組換え修復(HR repair)と非相同末端結合(non-homologous end joining;

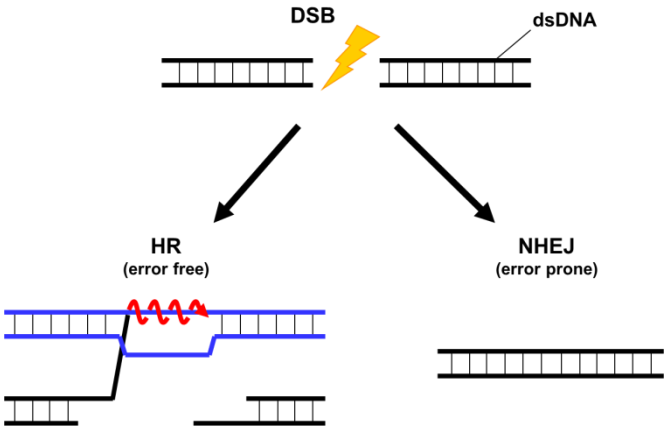


Fig. 1-1 DSB repair mechanisms

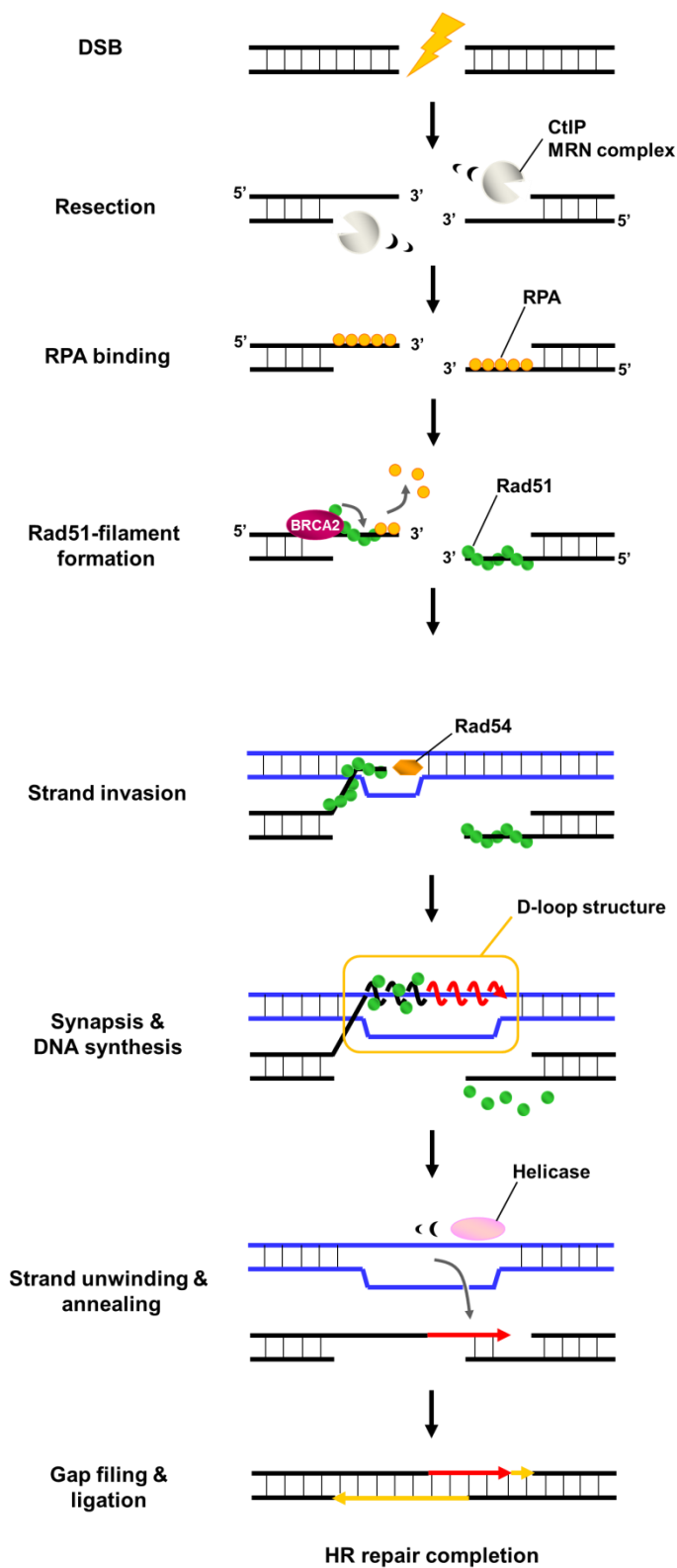


Fig. 1-2 The model of HR repair

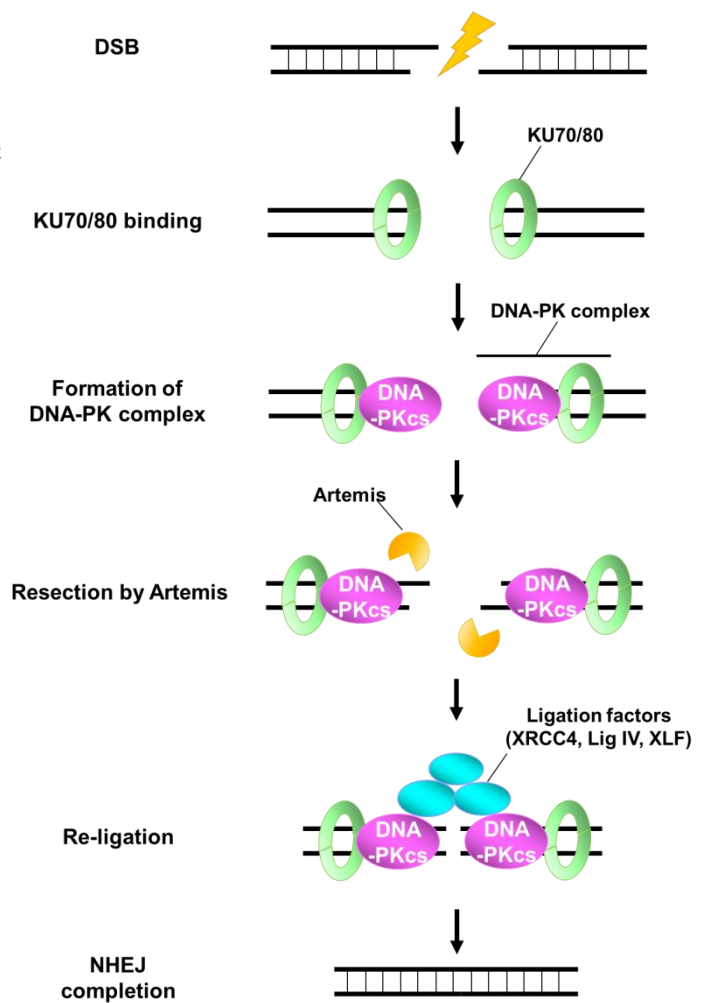


Fig. 1-3 The model of NHEJ

NHEJ) の二つが知られている(**Fig.1-1**)。HR 修復では、数百塩基以上の相同性を有する DNA 鎖 (相同染色体または姉妹染色分体) を鋳型とした DNA 合成により忠実度の高い修復を行う。ただし、相同染色体間で HR 修復が行われた場合には、ヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) にともなう劣性遺伝形質の発現に繋がる可能性がある。このため、高等真核生物においては、HR 修復は主として S 期以降に姉妹染色分体間で行われる修復過程であると考えられている。これに対し、NHEJ では切断末端をそのまま結合し修復する。ゆえに、NHEJ は欠失や挿入などの変異が生じやすい修復経路であると考えられている。両経路に関わるタンパク質群はそれぞれの修復経路において重要な役割を果たすとともに、もう一つの経路に対して抑制的に働くこともあり、両機構はお互いに制御し合いながら補完関係にあると考えられている。

1.3.2 相同組換え修復 (homologous recombination repair; HR repair)

高等真核生物の HR 修復は以下のような段階を経て行われる(**Fig.1-2**) (Branzei and Foiani 2008; Kim and D'Andrea 2012; Roy et al. 2012; Aze et al. 2013)。はじめに、CtIP および Mre11/Rad50/ Nbs1 複合体 (MRN 複合体) の 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により切断部の 5'末端が削り込まれ (5' resection)、3'末端が突出した一本鎖 DNA が形成される。次に、その露出した一本鎖部分に RPA (replication protein A) が結合し、DNA を直線化する。さらに Rad51 メディエーターと呼ばれるタンパク質 (出芽酵母では Rad52、高等真核生物では BRCA2) が結合し、Rad51 を一本鎖上へ呼び込む。Rad51 は RPA と交換され、一本鎖 DNA の周囲に Rad51 が連結して巻きつくように結合し、protein-DNA フィラメント (Rad51 フィラメント) を形成する。続いて、DNA 合成の鋳型となる相同 DNA を検索し、相同領域へ一本鎖 DNA が侵入する (strand invasion)。この過程には二本鎖 DNA 依存性 ATPase 活性を持つ Rad54 の機能が必要であり、Rad54 は相同鎖のクロマチン構造をリモデリングして Rad51 フィラメントを侵入しやすくすると考えられる。その後、相同部位への対合 (synapsis) により、D-loop と呼ばれる組換え中間体が形成される。相同鎖を鋳型として DNA 合成を行って欠落部分が修復され

た後、これらの中間体が DNA ヘリカーゼやヌクレアーゼにより解消されて、最後に DNA を連結して修復が完了する。HR 修復は DNA 修復時のみならず、第 4 節で後述するターゲットインテグレーションによる遺伝子破壊などにも寄与し、遺伝子工学においても重要な機構である。

1.3.3 非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ)

高等真核生物における NHEJ は以下のような段階を経て行われる(**Fig.1-3**) (Ahnesorg et al. 2006; Ciccica and Elledge 2010)。まず DSB 末端に DNA-PKcs/KU70/KU80 からなる DNA-PK 複合体が結合し、末端をキャップする。DNA-PKcs はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 関連キナーゼであり、自身を自己リン酸化するとともに、NHEJ に関与する因子である Artemis や XRCC4 をリン酸化し、リクルートや遊離を制御する。Artemis は DSB 末端のプロセッシングを行う。下流の因子として、足場タンパク質である XRCC4、NHEJ における DNA リガーゼとしてはたらく Ligase IV、両者をつなぐ XLF が存在し、これらの因子により DSB 末端が連結され修復が完了する。

NHEJ は鋳型を必要としない修復系であるため、細胞周期によらず実行できる。一方、修復時に欠失をとめないやすい error-prone (誤りがち) な機構である。近年は NHEJ のこういった性質を利用し、「DSB を人為的に導入して標的遺伝子配列を部分的に欠失させ遺伝子変異体を樹立する」という、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALEN、CRISPR/Cas9 などのゲノム改変技術も登場している(Hockemeyer et al. 2009; Bedell et al. 2012; Mali et al. 2013)。

1.3.4 複製チェックポイント機構

複製チェックポイントは、細胞が S 期中に DNA 損傷や複製ストレスを受けた時、細胞周期の進行の遅延と後期オリジンのファイアリングを抑制し、異常を解消するための時間を作り出す機構である(Busino et al. 2004; Brnzei and Foiani 2008; Finn et al. 2012)。脊椎動物の複製チェックポイントは以下のような分子機構で行われる。複製フォークが DNA 損傷や複製ス

トレスによって影響を受け ssDNA が露出すると、一本鎖 DNA 保護タンパク質である RPA が結合し、これが複製チェックポイント活性化の引き金となる。RPA 結合ドメインを持つ ATRIP を足場として、ATR-ATRIP キナーゼ複合体が ssDNA 上に結合する。一方、それらと独立して Rad9-Rad1-Hus1 からなるヘテロ 3 量体(9-1-1 複合体)が RPA 依存的に複製フォーク上にローディングされる。9-1-1 は環状構造をとる複合体(clamp)であり、一時的に開環し DNA 上に結合させる因子として Rad17 クランプロローダーを必要とする。さらに、ATR-ATRIP と 9-1-1 両方の複合体と結合する因子である TopBP1 もまた同じ部位にリクルートされる。TopBP1 は ATR のキナーゼ活性を亢進させる機能があるが、クロマチン上に滞留するには 9-1-1 との結合が必要である。このとき、9-1-1 の環状構造から突出した Rad9 の C 末テイル構造が TopBP1 との相互作用に重要であり、また、Rad9 の C 末テイルがリン酸化されることも必要である。近年、このリン酸化を担うキナーゼがカゼインキナーゼ 2 (CK2)であることが示された (Delacroix et al. 2007)。さらに、ATR の自己リン酸化が TopBP1 との結合を増強することも報告された(Liu et al. 2011)。TopBP1 との結合によりさらに活性化した ATR は、複製チェックポイントのキーファクターである Chk1 をリン酸化する。Chk1 もまたキナーゼであるが通常時は自己抑制されており、ATR 依存的リン酸化(ヒトでは Ser317 および Ser345)により活性化する。活性化した Chk1 は Cdc25 ホスファターゼをリン酸化する。Cdc25 は通常、cyclin dependent kinases (CDK) の脱リン酸化をおこなって細胞周期を S/G2 から M 期へ進行させる機能を持つが、Cdc25 リン酸化体はその役割が阻害され、結果的に細胞周期の停止または遅延が引き起こされる。

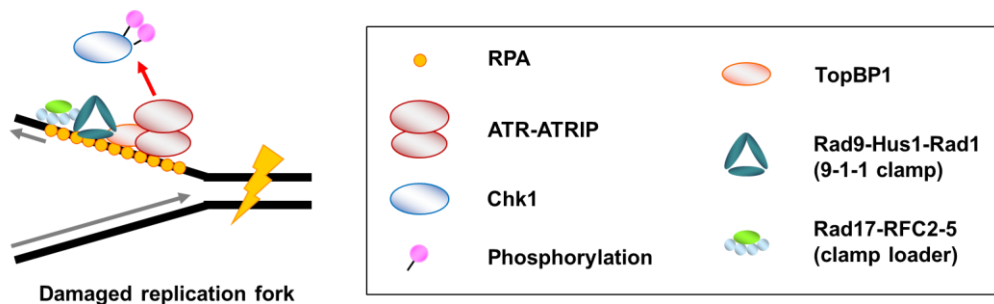


Fig. 1-4 The model of Replication checkpoint

第4節 ニワトリ B リンパ細胞由来 DT40 細胞とその実験系

1.4.1 ニワトリ DT40 細胞株の誕生、およびその高い相同組換え能

ゲノム DNA を含むプラスミドを高等真核細胞に導入すると、核に到達したプラスミドの一部がゲノムに取り込まれその一部になる。この過程をインテグレーションと呼び、大部分のインテグレーションはゲノム上の様々な位置にランダムに起こる(ランダムインテグレーション)。これに対し、プラスミドに含まれる DNA 断片と、それに相同な塩基配列を持つゲノム上の DNA とが相同組換えを起こして導入プラスミドがゲノムに取り込まれることがある(ターゲットインテグレーション)。比較的ターゲットインテグレーションが起こりやすいマウスの ES 細胞ですら、ランダムインテグレーションがターゲットインテグレーションに比べて 100 倍以上の頻度で起こる。このため、ターゲットインテグレーションによる高等真核生物における遺伝子破壊細胞の樹立は非常に困難であった。

DT40 細胞はトリ白血病ウイルス(avian leukosis virus; AVL)によりトランスフォームしたニワトリ B リンパ細胞株として樹立され、抗体遺伝子座の遺伝子変換能力を継代培養中にも失わず維持していた(Thompson et al. 1987; Buerstedde et al. 1990; Kim et al. 1990)。驚くべきことに、ニワトリ DT40 細胞においては *OVALBUMIN* のような転写の不活性な遺伝子座を含めて、調べたすべての遺伝子座でターゲットインテグレーションがランダムインテグレーションとほぼ同頻度で起こった(Buerstedde and Takeda 1991)。したがって、DT40 細胞は高等真核細胞の中で唯一、効率良く遺伝子をノックアウトできる細胞株であり、系統的な遺伝学的解析を行える細胞株として利用されている。

1.4.2 ニワトリ DT40 細胞株を使った研究のメリット

DT40 細胞はその高い相同組換え能の他に、以下に示すような優れた特徴を有する。

1. 現在のところ 7 種類の薬剤選択マーカー(Puromycin, Blasticidin, Histidinol, Bleomycin, Neomycin, Hygromycin, Ecogpt)が使用可能であり、最大 3 種類の遺伝子の重複ノックアウト

ができる。さらに、タモキシフェンで活性を厳密に制御できる Cre-LoxP リコンビナーゼを用いることで、理論上無限に遺伝子をノックアウトできる。

2. カリオタイプと細胞の表現型が安定である(ただし、2 番染色体といくつかのマイクロクロモソームはトリソミーである)。また、細胞の増殖速度が速いので(野生株は 39℃においてダブルリングタイムが 7.5 時間)、細胞を扱いやすい。

3. 致死変異導入のための条件変異細胞を作製できる。その方法として、(1)テトラサイクリン誘導プロモーターによる Tet-off システム(Wang et al. 1998)、(2)タモキシフェン依存性組換え酵素による Cre-loxP システム(Zhang et al. 1996)、(3)温度感受性変異株の作製 (DT40 細胞は 34~43℃まで広い範囲に渡って細胞の生存率を変化させることなく培養できる)(Fukagawa et al. 2001)、(4)degron 配列(aid 配列)を用いたタンパク質のプロテアソーム依存性分解システム(Nishimura et al. 2009)、の 4 種類がある。

4. ニワトリのゲノムプロジェクトの進行により、約 90%のゲノム情報が明らかとなっている。また、DNA 複製・組換え・修復に関わる遺伝子は出芽酵母から高等真核生物まで比較的高度に保存されており、出芽酵母やヒト、マウスの情報をフィードバックしつつ解析を行うことができる。

1.4.3 実験系としてのニワトリ DT40 細胞株と本研究の適合性

近年は RNA 干渉(RNAi)を用いたノックダウンによる遺伝子の機能解析が主流となっており、この手法は、1) 生物種の中でもヒト細胞を用いた解析ができる、2) トランスフェクションからサンプル回収まで 1~2 週間ほどで行える、という点で DT40 細胞を用いる場合よりも優れている。また、同じノックアウトであってもマウスを用いた方が、細胞と同時に個体の解析ができるため有用である。さらに、ヒト・マウスの方がデータベースや商業用の抗体が充実しているなどの利点もある。したがって、実験系を選択する上で単に遺伝子破壊が容易であるというだけで DT40 細胞を用いるのは適切とは言い難い。

しかしながら、ヒト細胞のノックダウンやノックアウトマウスの系と比較して、DT40 細胞

を用いた方が有利である場合が多々ある。以下にその例を示す。

1. ノックダウンではなくノックアウトの解析ができるため、siRNA やデグロン系で問題となる標的タンパク質の残存の影響がない。ゆえに、複数の遺伝子間での表現型の比較、すなわち系統的な遺伝学的解析が可能である。
2. 欠損が個体レベルで致死となり、ノックアウトマウス系と相性の悪い遺伝子であっても解析が容易である。
3. 不妊や早期がん化などの表現型によりノックアウトマウス同士の掛け合わせが難しい遺伝子であっても、遺伝子の多重破壊株の作製が可能である。
4. 増殖能の早さゆえ、一つの遺伝子のノックアウト株の樹立が 40～60 日程度で行える。よって、遺伝子の三重破壊株であっても理論上は半年程度で作製できる。

本研究において、第 2 章で扱う遺伝子はほとんどが欠損により胎生致死、不妊、あるいは高発がん性を呈する遺伝子であり、二重破壊株を用いた系統的な遺伝学的解析を行う上で DT40 細胞系が最適である。第 3 章で扱った *TIPIN*をはじめとする DNA 複製因子は、その欠損が胎生致死になることがほとんどであるためノックアウトマウスは作製されておらず、脊椎動物細胞でのノックアウトによるアプローチは DT40 細胞でなければ困難である。第 4 章の研究成果は、系統的な解析および遺伝子三重破壊株の作製ができなければ得られなかった。以上より、本研究で用いる実験材料として、DT40 細胞系は非常に良くマッチングしていると考えられる。

一方、近年は ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 などを用いたゲノム編集により、ヒトのノックアウト細胞や多数の生物種のノックアウト個体の作製が可能になりつつある。これらは革命的といえる手法だが、「細胞内にヌクレアーゼを過剰発現させてゲノム DNA に直接 DSB を導入する」という性質上、オフターゲット効果の問題が依然として解決されていない。今後の技術の発展に伴い改善が進むと考えられるが、現時点ではこれらのシステムと一過性の変異が残存し続ける培養細胞系は相性が悪い。こういった新技術と DT40 細胞のメリットをよく把握し、研究目的に応じた適切な実験系を選択していくことが望ましいと考えられる。

第5節 本研究の目的

第1節に記載したように DNA 複製・修復に関与する因子の同定は進んでいるものの、それらの分子機能の研究は遺伝子破壊の容易さ、扱いやすさなどから大腸菌や酵母などの単細胞生物において先行してきた。しかしながら、多細胞となった高等真核生物では関与する因子の数や種類が飛躍的に増加し、単細胞生物で得られた結果が必ずしも当てはまらないことが徐々に明らかになってきている。遺伝性疾患の原因遺伝子となる DNA 修復因子や、創薬の標的となりうる DNA 複製因子の分子機構を解明するにあたって、病因の解明や新たな治療法の確立へ繋げるためにも、高等真核生物細胞、特に脊椎動物細胞を用いた解析が不可欠となる。本研究では DNA 修復(第2章)を中心に、DNA 複製(第3章)、DNA 損傷によるアポトーシス(第4章)という3つの機構に関して、脊椎動物細胞の中で遺伝子破壊が容易に行えるニワトリ DT40 細胞を用いて、多数の DNA 複製・修復因子の新たな機能を解明することを目的とした。特に、第2章では当研究室で精力的に研究を行ってきた RecQ ヘリカーゼファミリーのうち、機能が未知であった RecQL5、第3章では当研究室で始動した DNA 複製因子の網羅的な遺伝子破壊株作製プロジェクトの標的の一つであった Tipin、第4章では DSB 誘導性アポトーシスの実行因子スクリーニングで同定された SNM ファミリーヌクレアーゼに焦点を当て、それぞれの細胞内における分子機能の解析を試みた。本研究の推進により、新規の分子機構の解明に留まらず、創薬ターゲットの同定や遺伝性疾患の病因の解明、治療法の確立のための新たな視点の発見を目指した。

第2章 DNA ヘリカーゼ RecQL5 の ICL 修復における機能の解析

第1節 序論

2.1.1 RecQ ヘリカーゼファミリー

DNA ヘリカーゼは、DNA 複製、修復、組換え、転写などの DNA 動態に際して、ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用して一本鎖 DNA 上を特定の方向に移動しながら相補鎖間の水素結合を切断し、その DNA に結合した相補的 DNA (または RNA) を解離させ、DNA-DNA、

DNA-RNA などの二重らせんを二本の一本鎖に巻き戻す酵素の総称である (Tuteja and Tuteja 2004; Fairman-Williams et al. 2010)。ゆえに DNA ヘリカーゼは ATPase 活性を持ち、高度に保存されたヘリカーゼモチーフを配列上に保持している (Fairman-Williams et al. 2010)。また、DNA 結合活性も併せ持つ。

RecQ ヘリカーゼファミリーは大腸菌 RecQ と相同性の高いヘリカーゼ領域をもつタンパク質の総称であり、大腸菌から酵母、ヒトまで高度に保存されている (Fig.2-1) (Chu and Hickson 2009; Rossi et al. 2010)。出芽酵母においては Sgs1、分裂酵母においては Rqh1 が、それぞれ唯一の RecQ ホモログとして同定されている。一方、ヒトにおける RecQ ヘリカーゼファミリータンパク質としては、RecQL1、BLM (RecQL2)、WRN (RecQL3)、RecQL4、RecQL5 の 5 種が知られており、そのうち BLM、WRN、RecQL4 はそれぞれブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロスモンド・トムソン症候群の原因遺伝子産物であることが明らかとなっている (Ellis et al. 1995; Yu et al. 1996; Kitao et al. 1999)。これらの遺伝性疾患では、高発がん性や早期老

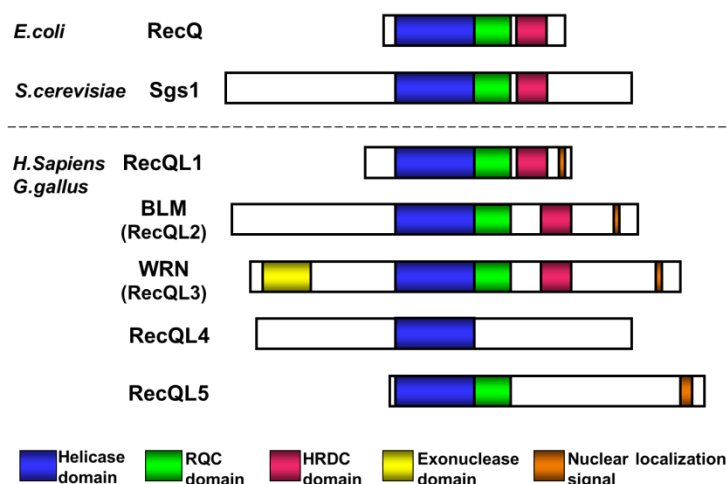


Fig. 2-1 RecQ helicase family

化症状を示し、その原因はゲノム安定性維持の破綻にあると考えられている。典型的な症状について **Table. 2-1** にまとめた。当研究室では human *RECQL1* 遺伝子を単離同定し、その遺伝子産物が DNA ヘリカーゼ活性を持つことを示した (Seki et al. 1994)。その後、RecQL1 のみ

Table.2-1 Comparison between BS, WS, and RTS.

	BS	WS	RTS
Cancer predisposition	○	○	○
Progeria symptom	-	○	○
Skin manifestation	○	○	○
Immunodeficiency	○	-	-
Sexual hypofunction	○	○	○
Skeletal abnormalities	-	-	○
Sun sensitivity	○	-	○
Short stature	○	○	○

Circle (○) indicates that the symptom is typical (Chu and Hickson 2009). BS; Bloom syndrome, WS; Werner syndrome, RTS; Rothmund-Thomson syndrome.

ならず RecQ ヘリカーゼファミリーすべての分子機能を明らかにすべく精力的に解析を進めている (Wang et al. 2000; Kawabe et al. 2001; Wang et al. 2003; Otsuki et al. 2007; Abe et al. 2011b)。

2.1.2 RecQL5

ヒト *RECQL5* 遺伝子は *RECQL4* 遺伝子とともに 1998 年に単離された (Kitao et al. 1998)。精製タンパク質を用いた解析により、ATPase 活性を保持し、DNA ヘリカーゼとしての生化学的活性を持つことも報告された (Garcia et al. 2004)。一方、これまで当研究室においてニワトリ DT40 細胞を用いた *RECQL5* 遺伝子破壊株の作製・解析がなされたが、細胞増殖能、死細胞の割合、紫外線およびメチルメタンスルフォネート (MMS) 感受性、mitotic chiasmata の形成頻度に関しては野生株と差がなかった (Wang et al. 2003; Otsuki et al. 2008)。このように細胞を用いた逆遺伝学的解析では表現型が得られず、その生理学的機能はほとんど不明であった。ただし、*BLM* との二重破壊株においてのみ細胞増殖速度の低下、死細胞の増加、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; SCE) 頻度の亢進などといった表現型が得られることから、RecQL5 が BLM 欠損時にのみバックアップとして働く DNA ヘリカーゼである可能性が示唆されていた (Wang et al. 2003; Otsuki et al. 2008)。

しかし近年、*RECQL5/Recql5* ノックアウトマウスが作製され、野生型と比較して高い発がん

ん傾向(自然発症発がん)を示すことが判明した(Hu et al. 2007)。野生型マウス 32 個体と *Recql5* ノックアウトマウス 50 個体を 22 ヶ月飼育したところ、野生型で 6% (2 個体)で腫瘍が観察されたのに対し、*Recql5* ノックアウトマウスでは 46% (23 個体)と高頻度で観察された。腫瘍の内訳は **Table. 2-2** にまとめた。さらに、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である

Table.2-2 Tumors found Recql5-deficient mice.

Tumor types	Numbers
Lymphoma	14
Squamous cell carcinoma	1
Lung adenocarcinoma	6
Heptocellular carcinoma	1
Breast carcinoma	1
Liver hemangioma	3

Total 26 tumors found in 23 *Recql5*^{-/-} mice.
3 mice had multiple tumors.
Reference (Hu et al. 2007).

る *APC* 遺伝子の片アレルに変異を持つマウスに、加えて *RECQL5* 遺伝子をノックアウトした二重変異マウスを作製したところ、大腸における腫瘍の形成数が *APC* 単独変異マウスに比べて有意に上昇した(Hu et al. 2010)。一方、*Recql5* ノックアウトマウスの寿命は野生型と差がないことから(Hu et al. 2007)、RecQL5/Recql5 は胚発生時や正常な成熟には必須でないものの、がん抑制因子としての機能を持つことが示唆された。現在までに RecQL5 に対応するヒト遺伝病は同定されていないが、ゲノム安定性維持機構への関与が強く示唆される。

さらに、RecQL5 は試験管内において相同組換え(HR)に必須な因子である Rad51 リコンビナーゼに直接結合することが報告された。加えて、試験管内において HR に必須な構造体である Rad51-ssDNA のヌクレオプロテインフィラメント(Rad51 フィラメント)から Rad51 を解離させる活性を持つことも判明し、アンチリコンビナーゼとしての機能が示唆されている(Hu et al. 2007; Schwendener et al. 2010; Islam et al. 2012)。最近、RecQL5 の持つドメインである BRC variant (BRCv) repeat が Rad51 との結合に必須であることも示された(Islam et al. 2012) (**Fig.2-2**)。これらの知見は、RecQL5 と HR 経路の関与を示唆している。

一方、RecQL5 は転写の活性にも影響を与えるという報告が近年相次いで発表された。ヒト RecQL5 は 5 つの RecQ ファミリーの中で唯一、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII)と免疫沈降可能な複合体を形成できる(Aygun et al.

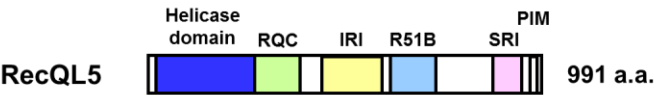


Fig. 2-2 The protein-interacting domains of human RecQL5
 IRI : Internal RNAP II -interacting domain
 R51B : Rad51-binding domain (BRCv repeat)
 SRI : Set2-Rpb1-interacting domain
 PIM : PCNA-interacting motif

2008)。また、RecQL5 は、1) RNAPII の large subunit である RPB1 と直接結合する(Aygun et al. 2008; Kassube et al. 2013)、2) 試験管内において RNAPII 依存的な転写活性を低下させる(Aygun et al. 2009)、3) IRI domain、SRI domain という特徴的なモチーフを有し、この 2 箇所 RNAPII と結合する(Islam et al. 2010; Kanagaraj et al. 2010)(Fig.2-2)、などの報告がなされている。これらの知見から、RNAPII 依存的な転写反応を負に制御する機能を持つ可能性が示唆された(Aygun and Svejstrup 2010)。ただし、*Recql5* ノックアウトマウスが正常に成長することから(Hu et al. 2007)、転写への影響は大きなものではないとする見方もある。近年、転写反応から転じて予期しない組換えが誘導されるという現象が示されており、これは転写に関連した組換え(Transcription-associated recombination; TAR)と呼ばれている(Aguilera 2002; Gottipati and Helleday 2009)。Rad51 と RNAPII の両者に結合するという性質から、RecQL5 は TAR を抑制することでゲノム安定性の維持に寄与しているのかもしれない。

以上のように、RecQL5 の機能に関する知見は徐々に蓄積されてきている。しかしながら、RecQL5 の細胞内における役割、特にがん抑制因子としてゲノム安定性維持にどのような分子機序で機能するかは不明な点が多く残されている。

2.1.3 ファンconi貧血とその原因遺伝子

ファンconi貧血(Fanconi anemia; FA)は高発がん性、進行性骨髓機能不全、発育不全などを特徴としたゲノム不安定性症候群である(Deans and West 2011; Crossan and Patel 2012; Kim and D'Andrea 2012)。FA 患者細胞は DNA 鎖間クロスリンク(interstrand crosslink; ICL)損傷を誘導する抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)およびマイトマイシン C (MMC)に対して著しい高感受性を示すことが知られている。臨床の現場において FA の診断を下す際、患者細胞を MMC で処理し染色体断裂が増加するか否かが重要な判断基準となっている。現在までに 16 遺伝子

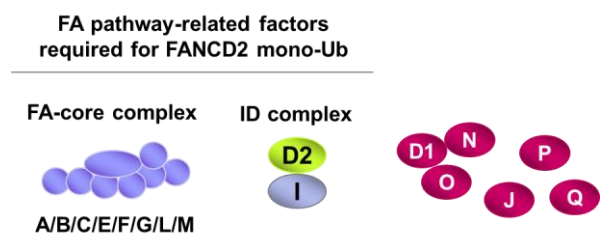


Fig. 2-3 Fanconi anemia genes

が FA 原因遺伝子として同定され(**Fig.2-3**)、それらの遺伝子産物が ICL 修復経路で機能する。これらの因子の遺伝子欠損細胞は例外なく DNA クロスリンク剤に高感受性を示す。

少なくとも 8 つの FA タンパク質(FANCA/B/C/E/F/G/L/M)とそれに付随するタンパク質が FA コア複合体を形成する。S 期中に複製ストレスを受けた時、FA コア複合体は E3 リガーゼとして機能し、FANCI-FANCD2 (ID)複合体をモノユビキチン化する。このユビキチン化は ID 複合体のクロマチン集積を促進し、またユビキチン結合タンパク質のリクルートに関与すると考えられている。ここまでの一連のカスケードは FA 経路(FA pathway)と呼ばれている。一方、ID 複合体のモノユビキチン化に必須ではない FA 遺伝子として *BRCA2 (FANCD1)*, *BRIP1 (FANCJ)*, *PALB2 (FANCN)*, *RAD51C (FANCO)*, *SLX4 (FANCP)*, *XPF (FANCG)* の 6 つが報告されている。このうち BRCA2, PALB2, RAD51C は HR 修復の実行に重要であり、欠損すると HR 修復効率が著しく低下する。これらのタンパク質は Rad51 を損傷部位にリクルートし、Rad51-ssDNA フィラメントの形成を促進する役割を持つ。BRIP1 は DNA ヘリカーゼ活性を持ち、GC-rich の DNA 配列で生じやすいグアニン四重鎖構造を解消する機能が報告されているが、この機能が ICL 修復に必要なのかは不明である。SLX4 および XPF はともに DNA スクレアーゼであり、HR 修復における組換え中間体の解消、およびヌクレオチド除去修復(NER)における損傷塩基の切り出し(incision)に関与することがそれぞれ示されていたタンパク質であり、近年ファンconi貧血の原因遺伝子であることが同定された(Crossan et al. 2011; Kim et al. 2011; Stoepker et al. 2011; Bogliolo et al. 2013; Kashiyaama et al. 2013)。これらのスクレアーゼは、ICL 損傷部位の切り出しに機能していると考えられている。ファンconi貧血患者のうち、上記の 16 遺伝子に変異が見つからない患者も存在し、今後も未知既知によらず新たなタンパク質が FA 原因遺伝子として同定される可能性がある。

2.1.4 ICL 修復

脊椎動物の ICL 修復は S 期において実行され、FA タンパク質に加えて、複製チェックポイント因子、核酸の切り出し(nucleolytic incision)に関与するスクレアーゼ、損傷乗り越え合成

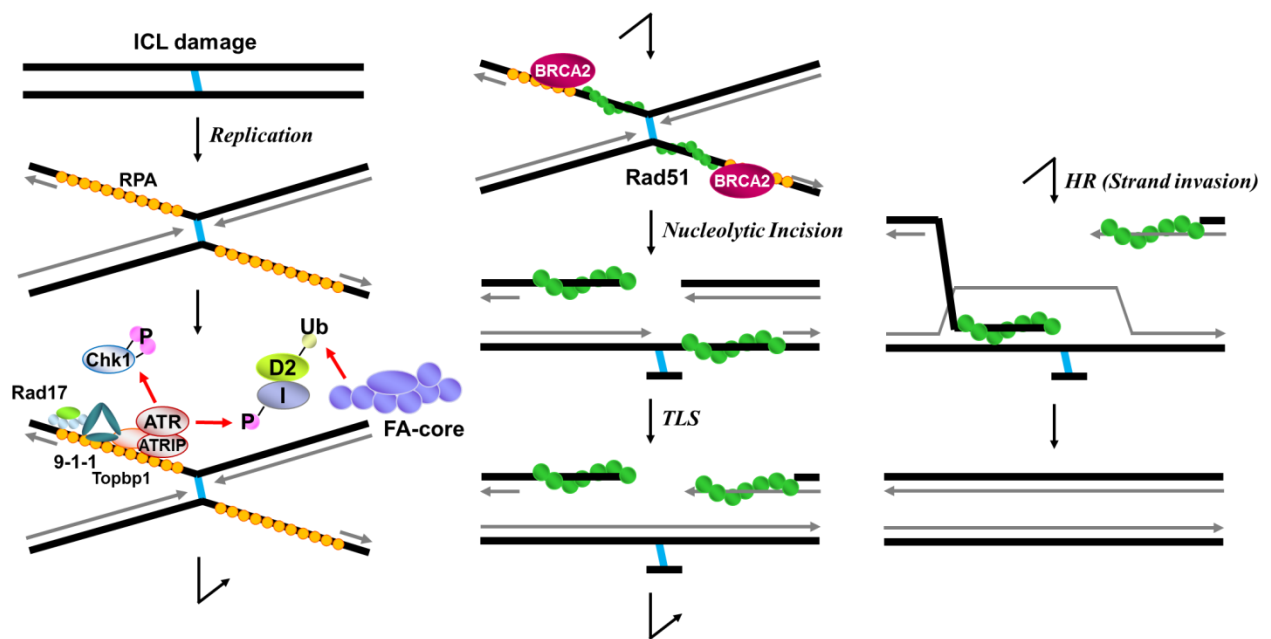


Fig. 2-4 The model of ICL repair

(translesion synthesis; TLS)因子、相同組換え因子など多数の修復タンパク質が協調的に関与する(**Fig.2-4**) (Deans and West 2011; Crossan and Patel 2012; Kim and D'Andrea 2012; Roy et al. 2012)。複製フォークが ICL と遭遇することで損傷が認識され、複製チェックポイントの活性化と FA コア複合体による ID 複合体のモノユビキチン化がおこなわれる。次いで、SLX4 や XPF などのヌクレアーゼによる ICL 部位の切り出しが起こり、DSB が産生される。クロスリンクが残存している染色分体は TLS ポリメラーゼにより損傷部位を乗り越えた DNA 合成が行われる。切り出しにより DSB が生じた染色分体は Rad51 依存的 HR 修復経路により修復される。Rad51 フィラメントはクロマチンリモデリング因子である Rad54 の補助を受けて姉妹染色分体に侵入し、それを鋳型として DNA 合成を行う。ID 複合体は USP1-UAF1 デユビキチナーゼ複合体により脱ユビキチン化されてクロマチン上から解離することが判明しているが、BRCA2-Rad51 の下流で ICL 誘導性 HR 修復がどのように完結するのかははっきりとはわかっていない。

第2節 結果

2.2.1 RecQL5 の ICL 修復への関与

RecQL5 の細胞内における詳細な機能を明らかにするために、我々は DT40 CL18 株を親株として *RECQL5* 遺伝子ノックアウト細胞を作製した。ヘリケーヌモチーフ Ia を含むエキソン 3-4 領域を欠失させる破壊用コンストラクトを使用し(Fig.2-5A)、遺伝子のノックアウトを RT-PCR により確認した(Fig.2-5B)。以前に報告したように、*RECQL5* 遺伝子の欠損は細胞の増殖能に影響を与えなかった(see Fig.2-11C)。

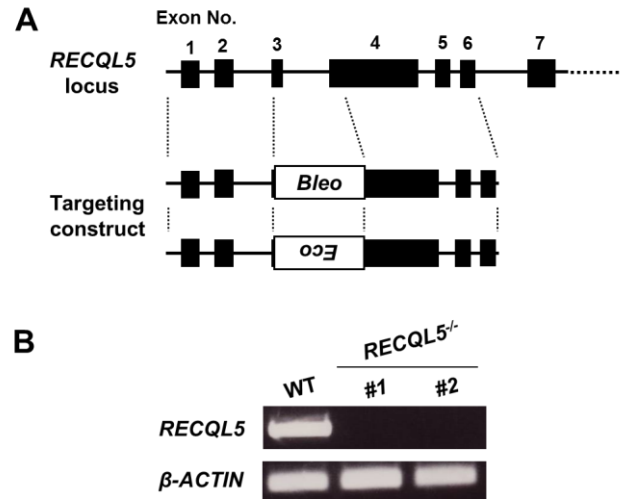


Fig. 2-5 Generation of *RECQL5* gene KO DT40 cell lines. (A) Schematic representation of the *RECQL5* gene locus and the gene targeting constructs. The constructs are designed to delete exons 3 and 4, including helicase motif Ia. (B) Confirmation of *RECQL5* gene disruption by RT-PCR. β -ACTIN gene is a control.

RecQL5 の DNA 修復機構への関与を検討するために、RecQL5 破壊株に様々な DNA 損傷を与え、感受性を調べた。興味深いことに、カンプトテシン(CPT)、エトポシド、ヒドロキシウレア(HU)、X-ray には野生株と同程度の感受性しか示さなかった一方で、CDDP、MMC といった DNA クロスリンク剤に高感受性を示すことが判明した(Fig.2-6)。これらの感受性は

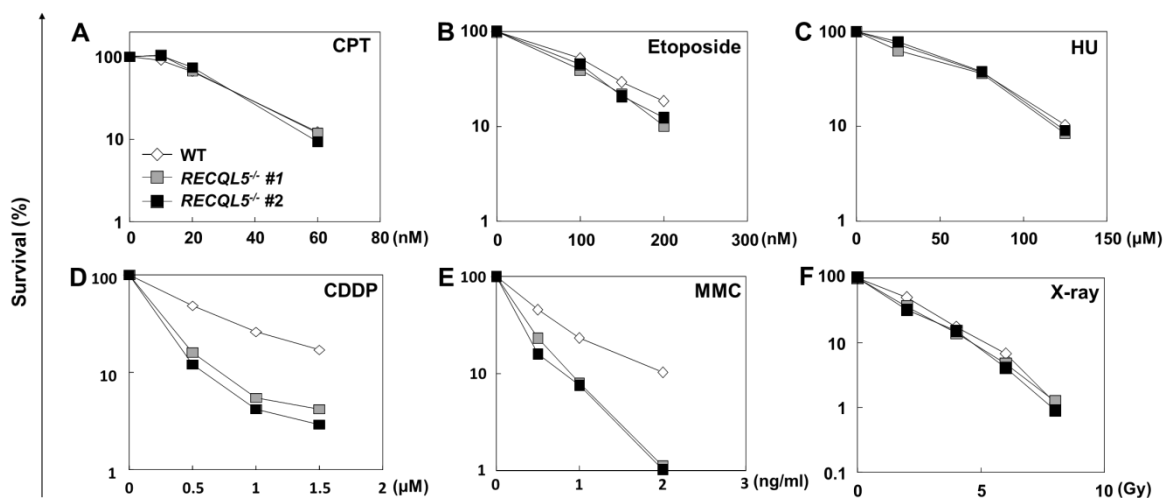


Fig. 2-6 Screening of sensitivity to DNA damage-inducing agents. Liquid survival assay. Cells were incubated for 36-45 h in the presence of various agents (A-E) or after exposure to X-ray (F). The number of viable cells was determined by flow cytometry.

human RecQL5—FLAG の発現により相補されたことから(Fig.2-7A)、感受性の原因は内因性の RecQL5 の欠失によるものと示唆される。二次元細胞周期解析により CDDP 処理時の細胞周期を観察したところ、*RECQL5* 破壊株では G1 および S 期の細胞の割合が減少し、G2/M および死細胞の集団である subG1 の細胞の割合が増加していた(Fig.2-7B)。さらに、就実大学薬学部 石井博士のご協力の下で、MMC の存在下ないし非存在下で細胞を培養し、染色体異常を観察した。MMC 非存在下では野生型と変わらなかったものの、MMC 処理時には野生型の 2 倍程度の染色体異常が観察された(Fig.2-7D; 就実大学 石井裕博士との共同研究)。特に、致死的な染色体異常である断裂(break)の割合が増加していることから、*RECQL5* 破壊株では MMC によるゲノム損傷が強まっていると考えられる。FA タンパク質のような ICL 修復に関与する因子を欠損すると、MMC 処理時に染色体異常が誘発されることが知られている。これらのデータは、RecQL5 が ICL 修復に関与することを示唆している。

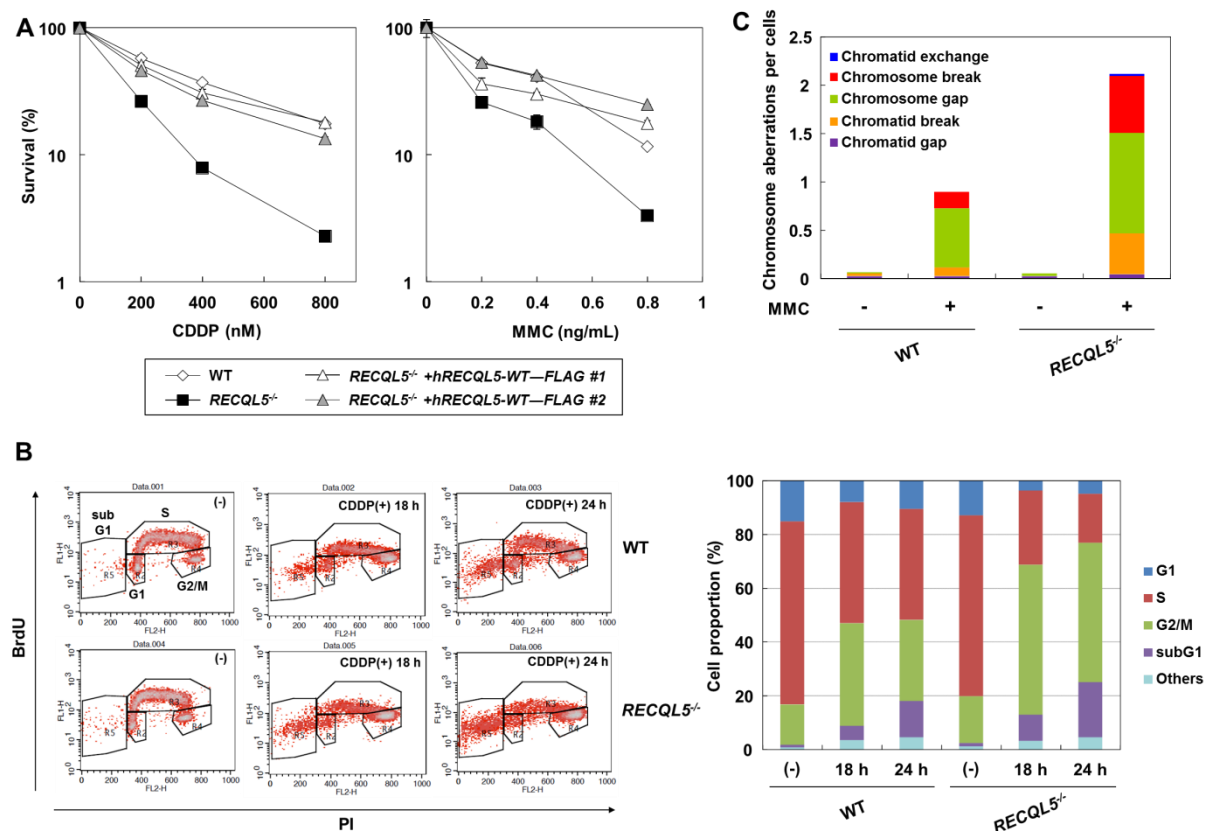


Fig. 2-7 ICL repair defect in RECQL5 KO cells.
 (A) Liquid survival assay. Cells were incubated for 48 h in medium containing cisplatin (CDDP) or mitomycin C (MMC). The error bars indicate standard deviation (SD).
 (B) Cell cycle analysis. Cell cycle distribution of cells treated with 1 μM CDDP was analyzed by flow cytometry (left) and quantitated (right).
 (C) Chromosome aberrations. Data are presented as the number of aberrations per 50 metaphases.

2.2.2 ファンコニ貧血経路との関連

ICL 修復はいくつもの修復経路が協調的、段階的にはたらい回しで行われる複雑な修復機構である。RecQL5 が ICL 修復のどの段階ではたらくのか明らかにするために、ICL 修復に関与する修復経路との関連を調べた。最初に、FA 経路との関係調べるために、FA 経路活性化の指標である FANCD2 のモノユビキチン化の検出をおこなった。FA コア構成因子の一つである FANCC を欠損すると E3 リガーゼである FA コア複合体が正常に形成できず、FANCD2 のモノユビキチン化が消失し、FA 経路が機能しなくなることが知られている (Kim and D'Andrea 2012)。FANCC 破壊株においては MMC 損傷後に FANCD2 のモノユビキチン化体(FANCD2 large form; FANCD2-L)が検出されなかったのに対し、RECQL5 破壊株では野生株と同様に検出された(Fig.2-8A)。さらに、RecQL5 が FANCD2 のクロマチンリクルートに必要なかどうか調べるために、FANCD2 の核内フォーカス形成を観察した。WT と RECQL5 破壊株は両方とも MMC 誘導性 FANCD2-foci が検出された(Fig.2-8B)。これらの結果は、RecQL5 欠損下においても FA 経路は正常に活性化すること示唆している。続いて、遺伝学的な解析を行うために RECQL5/FANCC 二重破壊株を作製した(Fig.2-9A)。RECQL5/FANCC 二重破壊株は

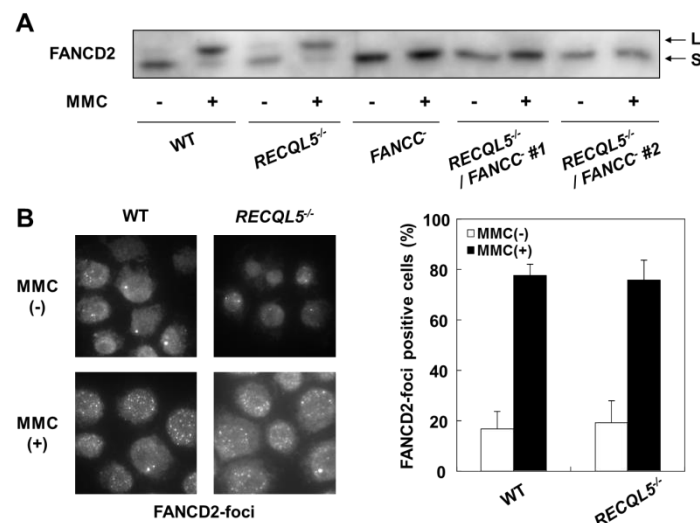


Fig. 2-8 Relation between RECQL5 and FA proteins
 (A) FANCD2 monoubiquitination. Cells were treated with 500 ng/mL mitomycin C (MMC) for 6 h and analyzed by Western blotting. L and S indicate ubiquitin-conjugated FANCD2 and FANCD2, respectively.
 (B) FANCD2-foci formation. Upper panel, images of cells treated or not treated with 500 ng/mL MMC for 6 h. Lower panel, percentage of FANCD2-foci positive cells. The error bars indicate SD from two independent experiments. At least 100 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive.

FANCC 単独破壊株よりも増殖能が低く、細胞死の割合が高かった(data not shown and Fig.2-9B)。CDDP 感受性を調べたところ、*RECQL5/FANCC* 二重破壊株は *FANCC* 単独破壊株よりも高い感受性を示した(Fig.2-9C)。これらの結果は、RecQL5 が FA 経路と遺伝学的に別経路ではたらくことを示唆している。

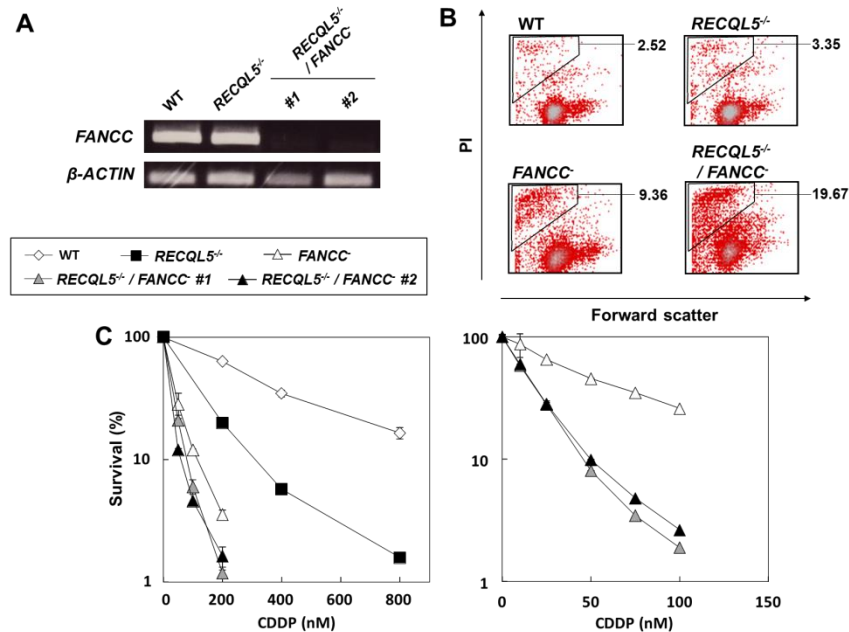


Fig. 2-9 Characterization of *RECQL5/FANCC* double KO cells.
 (A) Confirmation of *FANCC* gene disruption by RT-PCR. β -ACTIN gene is a control.
 (B) Detection of dead cells. Cells were stained with propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Forward scatter represents the size of cells. Enclosed area, which contains small-sized cells heavily stained with PI, represents the population of dead cells. Numbers indicate the % of dead cells.
 (C) Liquid survival assay. Cells were incubated for 48 h in medium containing high (left) or low (right) concentrations of cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

2.2.3 複製チェックポイント機構との関連

次に、RecQL5 と複製チェックポイントとの関係調べることにした。複製チェックポイントは FA 経路と独立して活性化し、一方の経路の欠損が他方の活性化に影響を与えないことが報告されている。実際に、複製チェックポイント因子の一つである Rad17 は、欠損しても FANCD2 のモノユビキチン化にはほぼ影響がないことがわかっている(Shigechi et al. 2012)。まず、*RAD17* 破壊株をコントロールとして、複製チェックポイントの活性化の指標である Chk1 のリン酸化について調べることにした。*RECQL5* 破壊株において、Chk1 のリン酸化は CDDP 処理時に正常に検出された(Fig.2-10A)。続いて、遺伝学的な解析を行うために

RECQL5/RAD17 二重破壊株を作製した(Fig.2-10B)。CDDP 感受性を調べたところ、*RECQL5/RAD17* 二重破壊株はそれぞれの単独破壊株よりも高い感受性を示した(Fig.2-10C)。これらの結果は、RecQL5 欠損下においても複製チェックポイントは正常に活性化し、RecQL5 は複製チェックポイントと遺伝学的に別経路ではたらく可能性を示唆している。

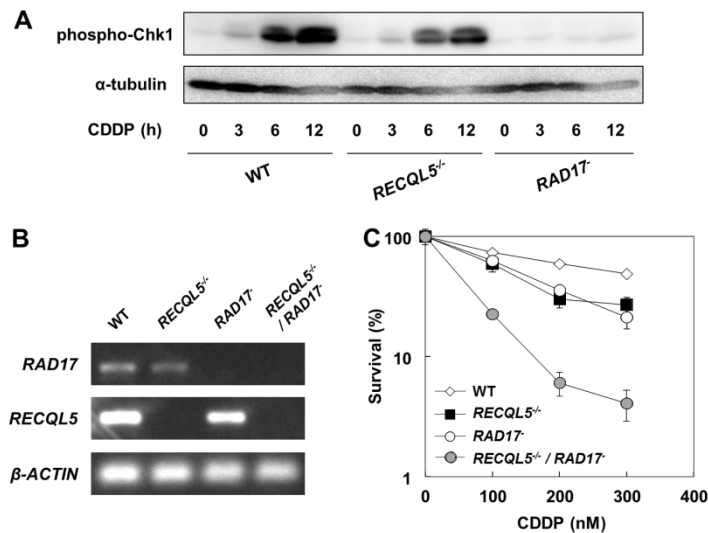


Fig. 2-10 Genetic analysis of RECQL5 mutation combined with RAD17.
 (A) Chk1 phosphorylation. Cells were treated with CDDP (1 μ M) and analyzed by Western blotting. α -tubulin is a loading control.
 (B) Confirmation of RAD17 gene disruption by RT-PCR. β -ACTIN gene is a control.
 (C) Liquid survival assay. Cells were incubated for 36 h in medium containing cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

2.2.4 相同組換え修復経路との関連 1 -BRCA2-

FA 経路と非依存的に、Rad51 が ICL 損傷部位にリクルートされる(Long et al. 2011)。RecQL5 と ICL 誘導性 HR 修復の関係を調べるために、我々は二重破壊株を用いた解析を試みた。*RAD51* 破壊株は致死であり解析が難しいが、FA 遺伝子の一つとして同定されており Rad51 フィラメントの形成に必要とされる *BRCA2/FANCD1* 遺伝子の破壊株は null 変異で生存可能であるため(Sonoda et al. 1998; Qing et al. 2011)、*RECQL5/BRCA2* 二重破壊株を作製した(Fig.2-11A)。親株は *BRCA2*^{+/+} 株とし、この株は 4-hydroxy tamoxifen (OH-TAM) 処理することで MerCreMer リコンビナーゼが活性化し、残存している *BRCA2* アレルが除去されて *BRCA2*^{-/-} null 破壊株となる(Fig.2-11A)(Qing et al. 2011)。リクローニング後、*BRCA2* mRNA が消失した株を選択し、*BRCA2*^{-/-} 株および *RECQL5/BRCA2*^{-/-} 株を得た(Fig.2-11B)。細胞増

殖能を測定したところ、*RECQL5*破壊株、*BRCA2*^{-/+}株、*RECQL5/BRCA2*^{-/+}株は野生株と同様の増殖能を示したが、*BRCA2*^{-/-}株はそれより低い増殖能を示した。また、*RECQL5/BRCA2*^{-/-}株は *BRCA2*^{-/-}と同程度に低い増殖能を示した(Fig.2-11C)。

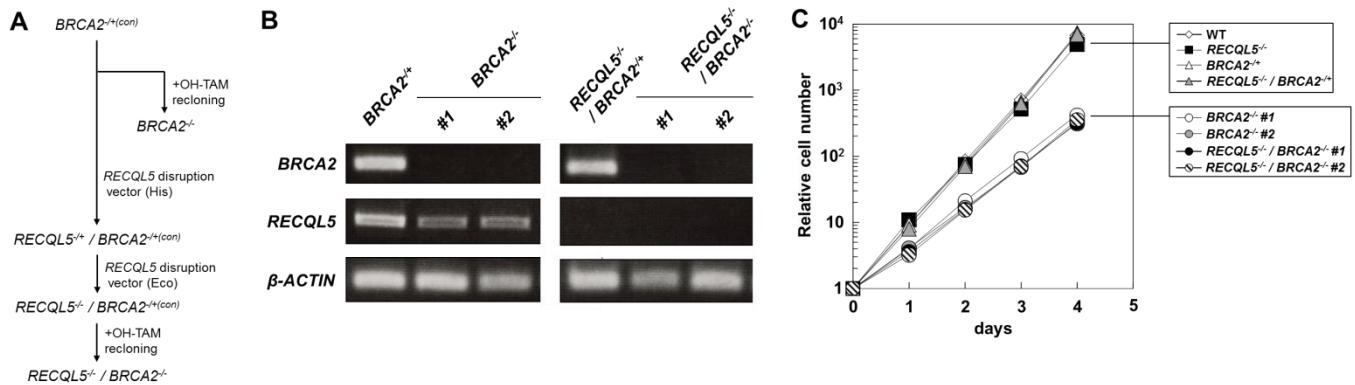


Fig. 2-11 Characterization of *RECQL5/BRCA2* double KO cells.

(A) Schematic representation of the gene targeting procedure. Cells were cloned after treatment with 20 nM 4-hydroxy tamoxifen (OH-TAM) for 2 days.

(B) Confirmation of *RECQL5* gene disruption by RT-PCR. *β-ACTIN* gene is a control.

(C) Growth curve. The number of viable cells was determined by flow cytometry.

次に、これらの株における Rad51 の損傷部位への集積を調べるために、細胞免疫染色を用いて Rad51-foci の観察をおこなった。Rad51-foci は細胞内における Rad51 フィラメント形成の指標として広く用いられている。野生株と *RECQL5*破壊株では MMC 損傷により Rad51-foci が強く誘導された。一方、*BRCA2*^{-/-}株では報告通りほとんど誘導されず、*RECQL5/BRCA2*^{-/-}株もまた同様であった(Fig.2-12A)。我々は、Rad51 のクロマチンへの結合に関してもクロマチン画分を抽出して調べた。野生株と *RECQL5*破壊株では MMC 損傷により Rad51 のクロマチン結合量が増加したが、*BRCA2*^{-/-}、*RECQL5/BRCA2*^{-/-}株では MMC 損傷の有無で結合量は変わらなかった(Fig.2-12B)。これらの結果は、RecQL5 が欠損しても Rad51 の損傷応答的なローディングは正常であり、そのローディングは RecQL5 の有無にかかわらず BRCA2 に従うことを示している。続いて、CDDP 感受性に関してエピスタシス解析をおこなったところ、*RECQL5/BRCA2*^{-/+}株は *BRCA2*^{-/+}株よりも高い感受性を示し、*BRCA2*^{-/-}株と *RECQL5/BRCA2*^{-/-}株は *BRCA2*ヘテロ株よりもさらに高い感受性を示した(Fig.2-12C)。重要なことに、*BRCA2*^{-/-}株と *RECQL5/BRCA2*^{-/-}株の感受性は同程度であり、この点は FANCC

や Rad17 の場合とは明らかに異なる。すなわち、RecQL5 の欠損下では Rad51 のローディングは起こるものの、BRCA2 と遺伝学的に同経路で機能することを示唆する。さらに、これらの株で ICL 誘導性 HR の頻度を調べるために、複製後に生じる HR の最終産物である SCE を CDDP 有無の条件下で計測した (Sonoda et al. 1999)。RECQL5/BRCA2-/-株において CDDP-induced SCE の頻度が BRCA2-/-株と比べて増加する傾向が見られた。一方で、BRCA2-/-、RECQL5/BRCA2-/-株では Spontaneous and CDDP-induced SCE がほとんど誘導されなかった (Fig. 2-12D)。以上の結果をまとめると、RECQL5 と BRCA2 は ICL 修復において遺伝学的にエピスタティック (epistatic) な関係にあり、RecQL5 は BRCA2 に依存して ICL 誘導性 HR 修復に関与する可能性が示唆される。

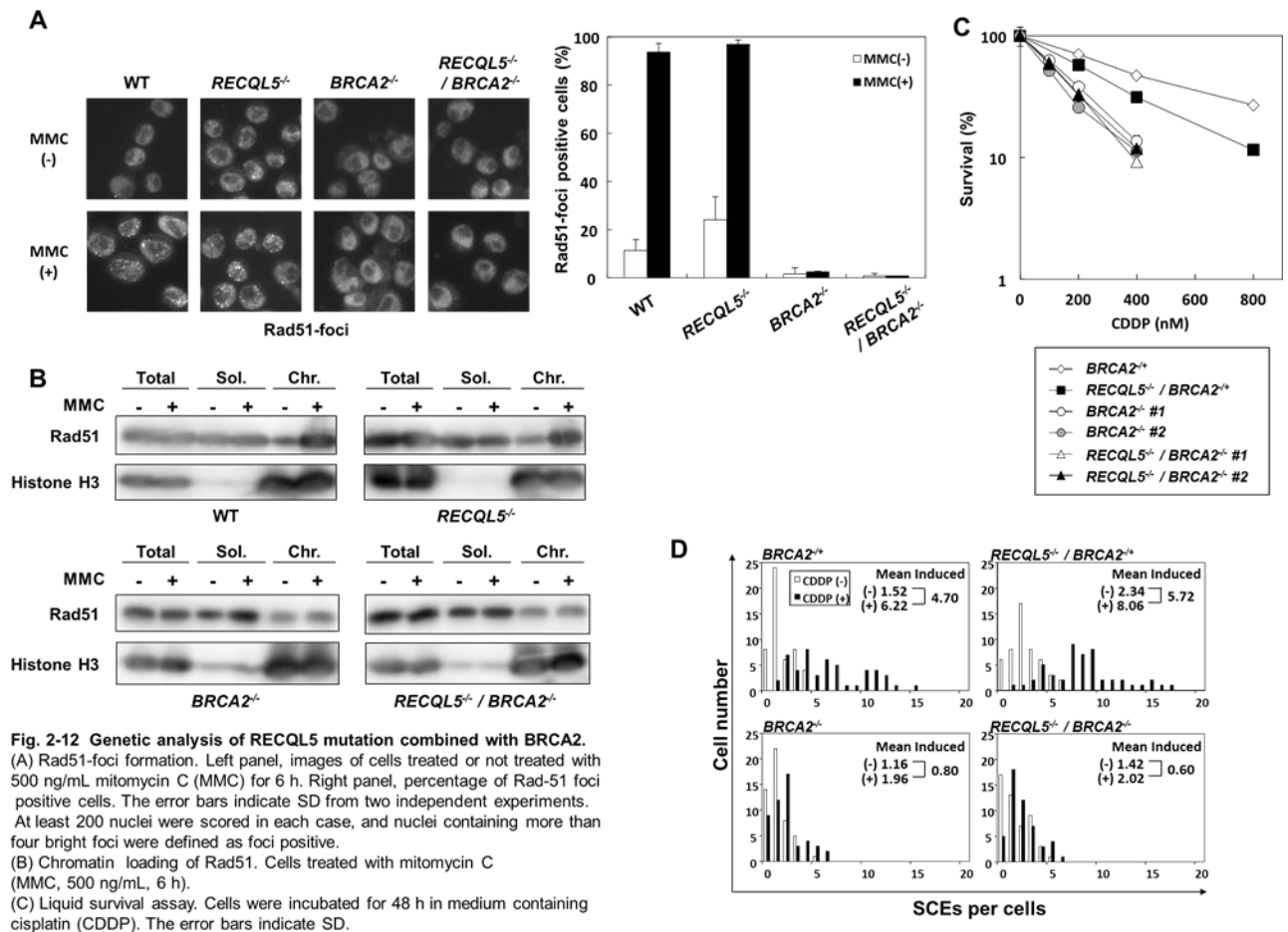


Fig. 2-12 Genetic analysis of RECQL5 mutation combined with BRCA2. (A) Rad51-foci formation. Left panel, images of cells treated or not treated with 500 ng/mL mitomycin C (MMC) for 6 h. Right panel, percentage of Rad-51 foci positive cells. The error bars indicate SD from two independent experiments. At least 200 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive. (B) Chromatin loading of Rad51. Cells treated with mitomycin C (MMC, 500 ng/mL, 6 h). (C) Liquid survival assay. Cells were incubated for 48 h in medium containing cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

2.2.5 相同組換え修復経路との関連 2-Rad51-

*RECQL5*破壊株において、ICL 修復の上流のシグナルである FANCD2 のモノユビキチン化、Chk1 のリン酸化および Rad51-foci 形成は正常に誘導された。これらのデータは、*RecQL5* の欠損は ICL 修復の初期段階に影響を与えないことを表している。そこで、ICL 修復の後期過程において *RecQL5* 欠損の影響が生じるかを調べるために、MMC 処理後の Rad51-foci の細胞内動態を観察した(Fig.2-13)。その結果、出現の過程は WT と *RecQL5* 破壊株において同様のパターンで誘導された。一方で、消失の過程が *RECQL5* 破壊株において野生株と比較して遅延した。このとき、*RECQL5* 破壊株における Rad51-foci の滞留は 2 通りに解釈できる。1) *RECQL5* 破壊株に ICL ダメージ処理をおこなったとき野生株と比べて DNA 損傷そのものが増え、その結果として Rad51-foci が多く誘導されている可能性、2) *RecQL5* は Rad51-foci が消失していく ICL 修復の後期段階で必要となる可能性、の 2 つである。もし前者であるならば、

RECQL5 破壊株で生じた DNA 損傷の多くが Rad51 を介した HR で修復されることになるため、*RECQL5/BRCA2* は各単独破壊株よりも低い増殖能や高い ICL 感受性を示すと考えられる。この仮説は前述の *RECQL5/BRCA2* 株の表現型と矛盾する(Fig.2-11,12)。ゆえに、我々は後者の仮説を支持する。

以上の結果は、*RecQL5* が ICL 修復の後期の段階にお

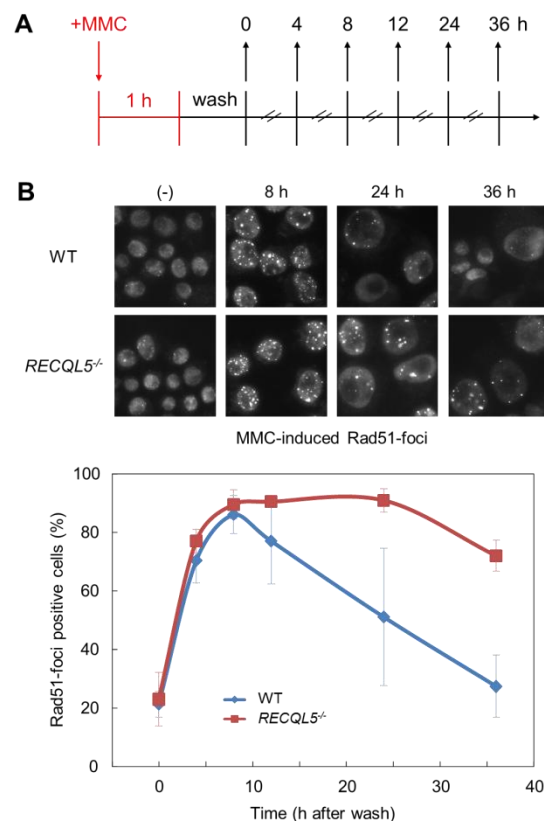


Fig. 2-13 Change of DNA damage signals in cells. (A) Schematic representation of sampling time after mitomycin C (MMC) (500 ng/mL) exposure. (B) Rad51-foci formation. Upper panel, images of cells treated with MMC. Lower panel, time course of the appearance of Rad51-foci positive cells. The error bars indicate SD from two independent experiments. At least 200 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive.

いて寄与する可能性を示唆している。

さらに、我々は RecQL5 と Rad51 の結合が、ICL 修復において重要であるかを調べた。米国 NIH Wang 博士、Islam 博士らのご協力により、細胞内において RecQL5 との結合を減弱させる点変異が同定されている (Islam et al. 2012)。RecQL5 は BRCv repeat と呼ばれるモチーフを介して Rad51 と結合し、このモチーフ内に含まれる残基のアラニン置換体である F666A、T668A などでは細胞内における Rad51 との結合が減弱する。また、これらの変異型 RecQL5 の精製タンパク質では、試験管内において Rad51 フィラメントを破壊する活性が低下する (Islam et al. 2012)。なお、これらの変異体で ATPase 活性は減弱しない。我々はこの変異体を *RECQL5* 破壊株に発現させ、CDDP 感受性が相補できるか感受性試験をおこなった。その結果、T668A 変異体では CDDP 感受性をほぼ相補できなかった (Fig.2-14A)。これは、RecQL5 が細胞内で ICL 修復において機能する際に、Rad51 との結合が重要であることを示唆する。加えて、RecQL5 の ATPase 活性の要求性についても検討した。ATPase 活性は DNA ヘリカーゼとしての機能に加え、Rad51 フィラメントを壊すアンチリコンビナーゼ活性にも必要であることが示唆されている。RecQL5 のヘリカーゼドメイン内残基のアラニン置換体である K58R 変異体では、試験管内での ATPase 活性がほぼ完全に消失し、Rad51 フィラメント除去活性も著しく低下するが、一方で Rad51 との結合は減弱しない (Garcia et al. 2004; Hu et al. 2007; Islam et al. 2012)。K58R 変異体発現細胞を用いて CDDP 感受性試験をおこなったとこ

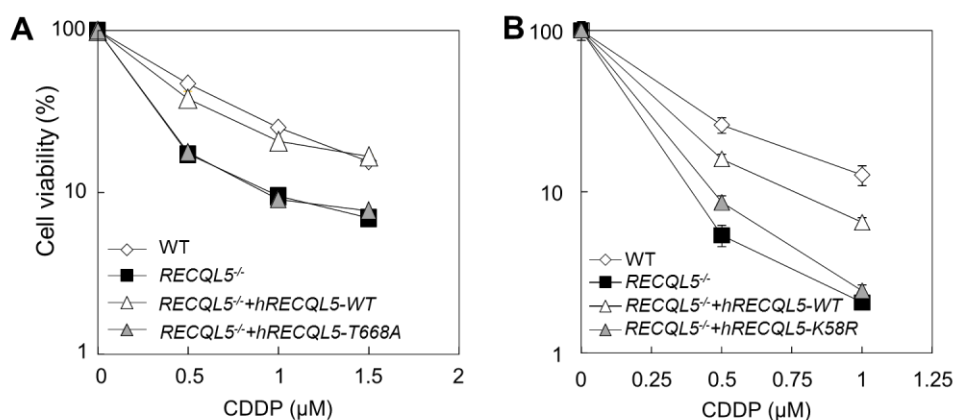


Fig. 2-14 Complementation test of CDDP sensitivity.

Liquid survival assay. Cells were incubated for 36 h (A) or 48 h (B) in medium containing cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

る、感受性はほとんど相補できなかった(Fig.2-14B)。以上の結果は、RecQL5 の ATPase 活性もまた ICL 修復において必要であることを示唆し、生化学的解析の結果と合わせると、RecQL5 の Rad51 フィラメントを除去する機能が細胞内における ICL 修復において重要である可能性が考えられる。

2.2.6 相同組換え修復経路との関連 3 -Rad54-

HR 修復の Rad51 フィラメント形成以後にはたらく因子として、Rad54 が知られている (Heyer et al. 2006; Mazin et al. 2010)。RecQL5 の HR 修復における後期過程との関連を調べるために、我々は *RECQL5/RAD54* 二重破壊株を作製し、遺伝学的解析を試みた。合成致死になる可能性を考慮し、human Rad54 の発現を doxycyclin (Dox) 添加により抑制できる *RAD54*^{-/-} +*hRAD54*-HA 株を親株として用いた(Fig.2-15A)(Morrison et al. 2000)。 *RECQL5* 遺伝子の両アレルを破壊し、RT-PCR により *RECQL5* mRNA の消失を確認した(Fig.2-15B)。

anti-HA タグ抗体を用いて Dox 添加後の hRad54-HA タンパク質の消失をウエスタンブロッティングにより確認した(Fig.2-15C)。細胞増殖能を調べたところ、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株は合成致死とはならなかったが、各単独破壊株よりも低い増殖能を示した(Fig.2-16A)。興味深いことに、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株は各単独破壊株と比べて非常に強い CDDP 感受性を示した(Fig.2-16B)。この点は、同じ ICL 誘導性 HR 修復に関わる因子であっても、BRCA2 に対して epistatic な表現型を示したことと大き

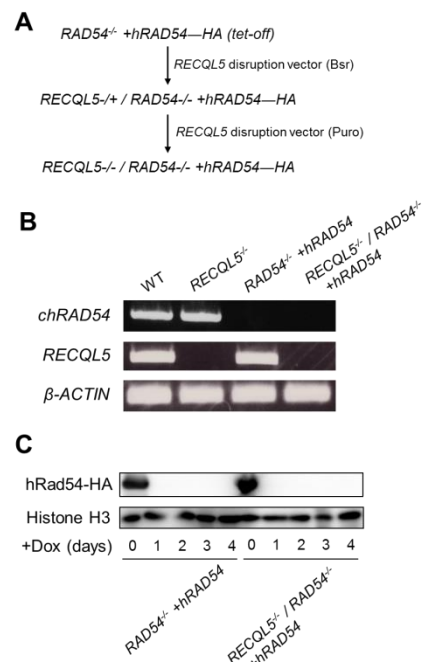


Fig. 2-15 Characterization of *RECQL5/RAD54* double KO cells. (A) Schematic representation of the gene targeting procedure. Cells were used after treatment with 1 μ g/mL doxycyclin (Dox) for 5 days. (B) Confirmation of *RECQL5* gene disruption by RT-PCR. β -ACTIN gene is a control. (C) Confirmation of the disappearance of human Rad54 proteins with anti-HA antibody by Western blotting. Histone H3 is a loading control.

く異なる。さらに、これらの株において Rad51-foci を観察した。注目すべきことに、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株では Spontaneous Rad51-foci が約 60% も誘導されており、各単独破壊株と比べて相加的な表現型を示している(Fig.2-16C)。MMC-induced Rad51-foci のキネティクスを見たところ、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株において消失がより遅れる傾向が観察された(Fig.2-16D)。以上の結果は、RecQL5 と Rad54 の両方が ICL 誘導性 HR 修復において Rad51 フィラメントの形成以後にはたらき、並行して Rad51 フィラメントの代謝に寄与することを示唆する。

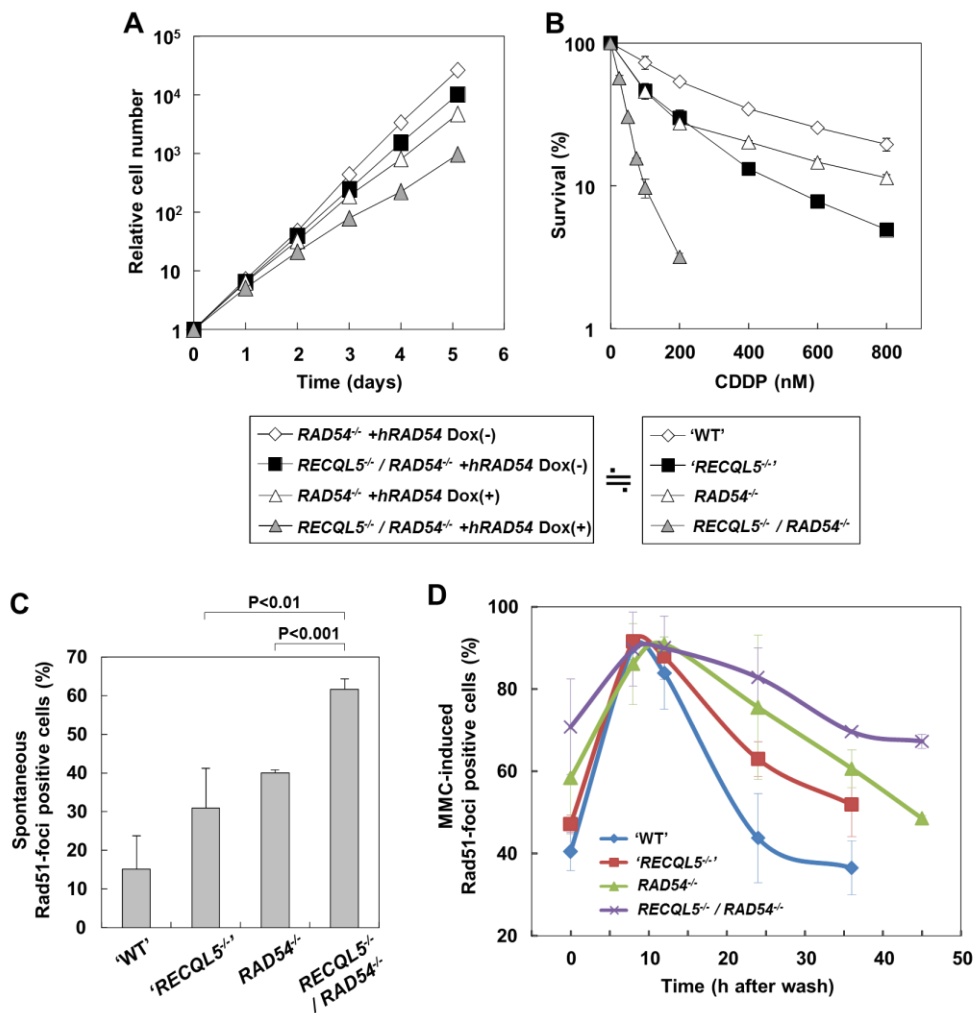


Fig. 2-16 Genetic analysis of RECQL5 mutation combined with RAD54.

(A) Growth curve. The number of viable cells was determined by flow cytometry.

(B) Liquid survival assay. Cells were incubated for 48 h in medium containing cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

(C) Spontaneous Rad51-foci formation. The error bars indicate SD from three independent experiments. At least 250 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive. P values were calculated by Student's t-test.

(D) Mitomycin C (MMC)-induced Rad51-foci formation. Cells were treated with MMC and washed as described in the figure legend for Figure 2-13A, and then harvested at the indicated time points. The plots represent mean and SD from two independent experiments. At least 200 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive.

2.2.7 免疫グロブリン遺伝子座における組換え

ICL 誘導性 HR 修復の頻度と多様性を評価するために、我々は免疫グロブリン領域における組換えについて調べた。DT40 細胞では Ig V locus において HR を介した遺伝子改変が恒常的に起こっており、この組換えは免疫グロブリン遺伝子変換(immunoglobulin gene conversion; IgGC)と呼ばれる(Sale 2004; Tang and Martin 2007)。IgGC は V gene の上流に存在する 25 個の pseudo V (Ψ V) gene 断片をドナーテンプレートとして使用し、V gene の DNA 配列を HR により組み換えることで抗体の多様性を生み出している(Fig.2-17A)。IgGC 頻度を測定するために、免疫グロブリン軽鎖の V 領域(V λ)にフレームシフト変異(+1 グアニン塩基の挿入)を持つために表面 IgM (sIgM)を細胞膜表面に発現できない CL18 subline をアッセイに用いた。

このフレームシフト変異

が除去されると正常に免疫グロブリンがコードさ

れ、細胞膜表面に sIgM

が発現するようになるが、

これは大半が IgGC によ

りおこなわれる。この

sIgM(-) から (+) への

復帰(reversion)を sIgM+

gain と 呼 び 、

sIgM-positive cell の割

合をフローサイトメトリ

ーを用いて測定すること

で、間接的に IgGC 頻度

を 測 定 で き る

(Fig.2-17A)。

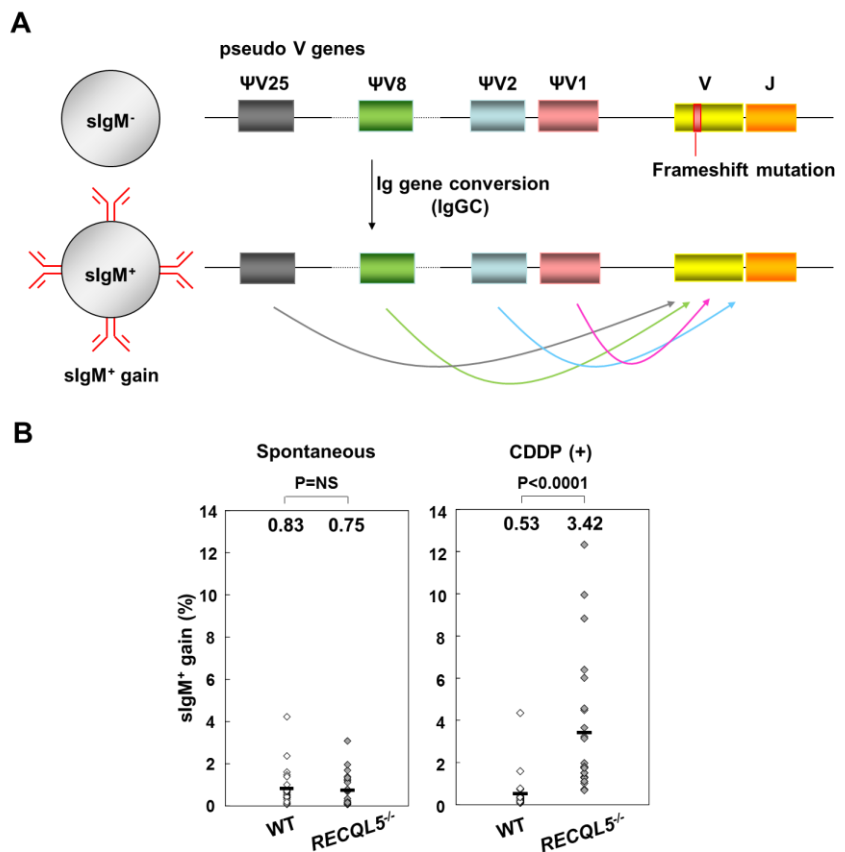


Fig. 2-17 Analysis of IgGC events at the light chain locus.

(A) Schematic representation of sIgM⁻ to sIgM⁺ conversion. The detail is described in the text. (B) Fluctuation analysis of sIgM⁺ gain. Cells were subcloned by limiting dilution (n = 24 for each genotype) and kept in culture in the absence of cisplatin (CDDP) for 30 days (left) or in the presence of CDDP for 8 days (right) after subcloning. Diamonds represent percentage of sIgM-positive cells in each clonal subpopulation. Lines and numbers indicate mean of % of sIgM⁺ gain. P values were calculated by Student's t-test. NS, statistically not significantly different.

まず薬剤未処理の条件で野生株と *RECQL5*破壊株を 30 日間培養し、sIgM-positive cell の割合を測定したところ、両者にはほとんど差がなかった(**Fig.2-17B left**)。一方で、CDDP の存在下で細胞を培養し、8 日後に sIgM-positive cell の割合を測定したところ、*RECQL5*破壊株のサブクローンの平均が野生株のそれと比較して 6.5 倍程度に増加していた(**Fig.2-17B right**)。これは *RECQL5*破壊株において CDDP-induced IgGC が高頻度で生じていることを示唆する。重要なことは、野生株においては CDDP 処理の有無で sIgM(+) gain がほぼ変わらないということである。CDDP-induced sIgM(+) gain は *RecQL5* を欠損することによって観察された表現型であり、CDDP 処理によって IgGC が誘発される可能性を示す初めての例である。IgV locus において、AID によるシトシンの脱アミノ化が Spontaneous IgGC を誘発することが知られている(Arakawa et al. 2002)。CDDP-induced IgGC が AID に依存して生じるか調べるために、*RECQL5/AID* 二重破壊株を作製した(**Fig.2-18A**)。 *RECQL5/AID* 二重破壊株の CDDP 感受性は *RECQL5* 単独破壊株と変わらなかった(**Fig.2-18B**)。これらの株で CDDP 処理時の sIgM(+) gain を調べたところ、*RECQL5/AID* 二重破壊株では sIgM-positive cell の割合がまったく増加しなかった(**Fig.2-18C**)。このデータは、*RecQL5* 欠損下で観察される CDDP-induced IgGC は AID に依存することを示唆している。

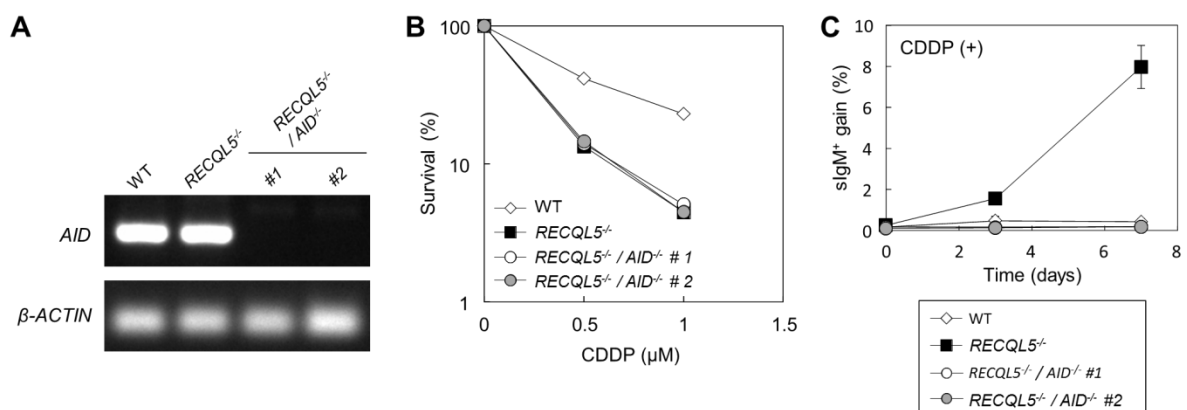


Fig. 2-18 Characterization of *RECQL5/AID* double KO cells.

(A) Confirmation of AID gene disruption by RT-PCR. β-ACTIN gene is a control.

(B) Liquid survival assay. Cells were incubated for 48 h in medium containing cisplatin (CDDP). The error bars indicate SD.

(C) Time course of sIgM⁺ gain. Cells were cultured in medium containing CDDP and the proportion of sIgM⁺ cells was measured at the time indicated. The error bars indicate SD from two independent experiments.

次に、RecQL5がHR修復の頻度だけでなく多様性に関与するか調べるために、sIgM-positive cellのIgV λ locusのシーケンス解析を試みた。CL18細胞ではCDR1領域に挿入されたグアニン1塩基によりフレームシフトが生じ、免疫グロブリンをコードできなくなっている。このinsertionがIgGCによって除去されることでsIgM(-) to (+) reversionが起こるが(Fig.2-17A)、この領域と Ψ V8が Ψ V genesの中で特に相同性が高い(Buerstedde et al. 1990)。ゆえに、 Ψ V8が最も高頻度でIgGCのドナーテンプレートとして使用される。復帰したsIgM-positive細胞からV geneをクローニングし、reversionに使用されたドナーテンプレートの内訳を調べること、IgGCの多様性を調べることができる。薬剤無処理の場合、野生株とRecQL5破壊株の両方とも Ψ V8の使用率が100%であった(Fig.2-19 left)。対して、野生株の場合、CDDP存在下で培養した時は Ψ V8以外のドナーの使用が22.4%に増加した(Fig.2-19 right)。すなわち、野生株におけるCDDP-induced IgGCは頻度こそ変わらないものの、使用するドナーのパターンは変化するということである。驚くべきことに、RECQL5破壊株の場合、半数以上の54.3%が Ψ V8以外のドナーを使用しており、多様性が増加していた(Fig.2-19 right)。これらの結果は、RecQL5がCDDP-induced IgGCの頻度と多様性の両方を制御することを示唆しており、RecQL5の欠損時には正確性の低いドナーとの組換えが多発するのかもしれない。

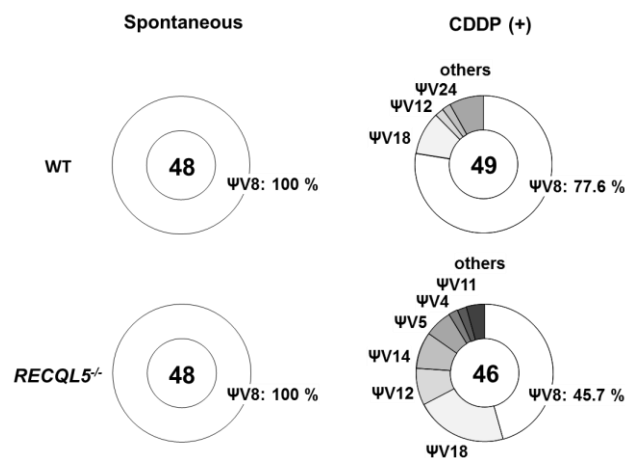


Fig. 2-19 Usage of Ψ V genes as a donor for IgGC.
Surface IgM-positive fractions were isolated from cells used in Figure 2-17B, and the nucleotide sequences of rearranged V λ genes were analyzed. The total number of V λ sequences analyzed is indicated in the center of the charts.

第3節 考察

2.3.1 RecQL5 の ICL 修復における役割

今回我々は、*RECQL5* 遺伝子ノックアウト DT40 細胞が DNA クロスリンク剤に特異的な高感受性を示すことを報告した。これは *RECQL5* 遺伝子に変異を導入したショウジョウバエの個体が野生株と比較して CDDP 感受性が高いという最近の報告とも合致する (Maruyama et al. 2012)。また、ヒト HeLa 細胞において CDDP 処理時に PCNA と共局在する RecQL5-foci が形成されるという報告や、ヒト RecQL5 がソラレン誘導性クロスリンクダメージに集積するという最近の報告もあり (Kanagaraj et al. 2006; Ramamoorthy et al. 2013)、これらは RecQL5 が ICL 修復において種を超えて機能することを強く示唆する。RecQL5 は FA コア関連タンパク質のように FANCD2 のモノユビキチン化に関与するのではなく、BRCA2 に依存した ICL 誘導性 HR 修復において機能する (第2節 第4項)。同様に BRCA2 に関連してはたらく FA 原因遺伝子産物として PALB2, Rad51C などが挙げられるが、これらの因子と異なり RecQL5 欠損時でも Rad51-foci はダウンレギュレートされず、むしろ消失が遅れて滞留する様子が観察される (第2節 第5項)。これは RecQL5 が ICL 誘導性 HR 修復において Rad51 フィラメントの形成以後の機能する可能性を示唆する。注目すべきは、多くの ICL 修復に関与する因子 (FA コア複合体や Rad51 パラログ、Rad54、Mcm8-Mcm9) の欠損時のように ICL-induced HR 頻度が低下するのではなく (Heyer et al. 2006; Nishimura et al. 2012)、RecQL5 欠損時にはむしろ増加するという点である (Fig.2-12D,17B)。これは RecQL5 の HR を負に制御する機能が、ICL 修復に促進的にはたらくことを示唆している。

では、ICL repair において、RecQL5 はどのような役割を担うのだろうか？ 近年、アフリカツメガエル卵抽出液と ICL plasmid を用いた無細胞実験系により、ICL 修復の分子機構が明らかにされつつある (Raschle et al. 2008; Knipscheer et al. 2009; Long et al. 2011)。彼らは以下のような、複製に共役した ICL 修復のモデルを提唱している。(i) late S-G2 phase において ICL site に二つの複製フォークが接近して停止する。(ii) ラギング鎖に生じた ssDNA gap に RPA が結合する。(iii) DNA 切断よりも前に、Rad51 が ssDNA 上にリクルートされる。

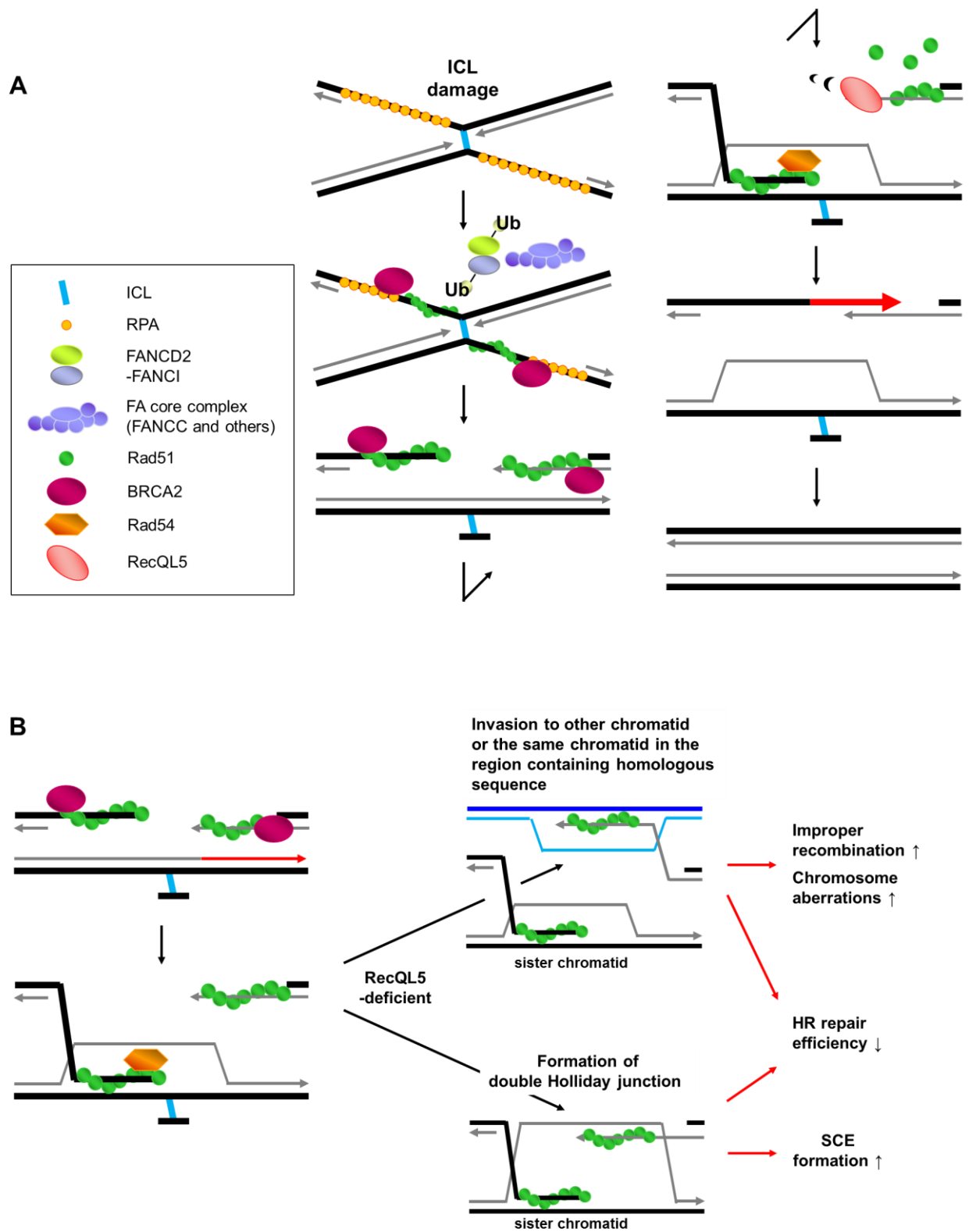


Fig. 2-20 Model of ICL repair including RecQL5. The detail is described in the "Discussion" section.

(iv) ID complex がモノユビキチン化され、ヌクレアーゼにより ICL site が切断される。同時に損傷を乗り越えた合成がおこなわれる。(v) DSB が生じた染色分体は、直前に合成が完了した姉妹染色分体を鋳型に HR 修復で修復される。本研究の結果より、RecQL5 は Rad51-フィラメントの形成や FANCD2 のモノユビキチン化の後ではたらくと推察される。また、以前の生化学的解析より、RecQL5 は Rad51-ssDNA フィラメントから Rad51 を解離させる活性を持つ(Hu et al. 2007)。これらの知見は、RecQL5 が細胞内において Rad51-フィラメントの除去を通じて ICL 誘導性 HR 修復を促進する可能性を強く示唆する(Fig.2-20A)。標的となる Rad51 フィラメントは複数考えられる。一つは、nucleolytic incision 後にクロスリンクが残存した側の染色分体に残された Rad51-フィラメントであり、これは損傷乗り越え合成の後の DNA 合成の伸長を阻害する。RecQL5 は余分な Rad51 フィラメントを取り除き、DNA 合成を促進する役割があるのかもしれない。この点は ICL plasmid の系を用いて今後検討すべきである。もう一つは、切断され DSB が生じた染色分体に形成された 2 つの Rad51 フィラメントである。一方の Rad51-フィラメントが姉妹鎖に侵入して D-loop 構造を形成した時、他方の Rad51-フィラメントは不要となる。RecQL5 は、この不要となった Rad51-フィラメントを除去することで、複雑な組換え中間体の形成を防いでいるのかもしれない(Fig.2-20B)。また、侵入した側の鎖から用済みの Rad51 フィラメントを除去し、DNA 組換え反応を効率的に進めていることも考えられる。特に、RecQL5 の欠損により他方の Rad51-フィラメントが活性型のまま残ると、second end capture による double Holliday junction (dHJ)構造の形成や姉妹鎖以外の相同鎖への侵入を誘発し、修復の効率低下や不適切な組換えが生じると予想される。

2.3.2 RecQL5 と Rad54 の Rad51 フィラメントへの異なる作用

Rad54 は Rad51 フィラメントの形成以後に HR に関与し、相同鎖侵入や D-loop 形成後の分岐点移動を担う(Heyer et al. 2006; Mazin et al. 2010; Qing et al. 2011)。RAD54 破壊株ではこれらの機能が損なわれるために HR 反応を停止した Rad51 フィラメントが蓄積し、Rad51-foci の増加や HR 修復効率の低下という表現型が現れると考えられる。我々は RECQL5/RAD54

二重破壊株が相加的な CDDP 感受性を示すこと、および過剰な Rad51-foci の蓄積が観察されることを明らかにした(第 2 節 第 5 項)。以前に *RECQL5/BRCA2* 二重破壊株について述べたことと同様に(第 2 節 第 4 項)、*BRCA2/RAD54* 二重破壊株は *BRCA2* 単独破壊株と同程度の増殖能や CDDP 感受性を示す(Qing et al. 2011)。ゆえに、RecQL5 and/or Rad54 の欠損により生じた Rad51-foci の滞留は DNA 損傷そのものの増加によるのではないと考えられる。

ではなぜ、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株はこれほど著しい CDDP 感受性を示すのか？ Rad51 フィラメントの機能をいわば正に促進する Rad54 に対し、RecQL5 は除去、いわば負に制御している。RecQL5 と Rad54 の両方を欠損すると、形成された Rad51 フィラメントは相同鎖への侵入もできず、また除去されて NHEJ あるいはその他の末端結合修復(e.x. single strand annealing)にスイッチすることもできず、HR 反応が途中で停止してしまい細胞の生存にとって重篤な状況となるのかもしれない(Fig.2-21)。興味深いことに、NHEJ 因子の一つである KU70 を欠損した DT40 細胞は野生株と同程度の CDDP 感受性しか示さないのに対し、*RAD54/KU70* 二重破壊株は *RAD54* 単独破壊株以上の CDDP 感受性を示す(Nojima et al. 2005)。これは、Rad54 の

欠損条件下では、ICL 修復の過程で生じた DSB は一部 NHEJ で代替されて修復されている可能性を示唆する。また、出芽酵母において RecQL5 の機能的なホモログである Srs2(後述)と Rad54 の同時欠損は致死となり、さらに Rad51 の変異を導入することにより致死性が相補される。この表

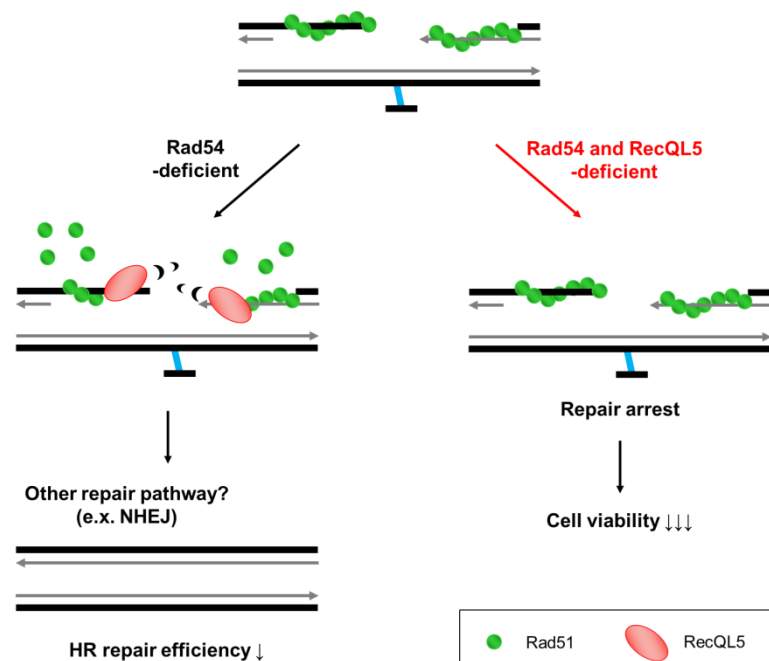


Fig. 2-21 Model of defect of *RECQL5/RAD54* double KO cells in HR repair. The detail is described in the "Discussion" section.

現型は上記に示した考察と良く合致しており、脊椎動物細胞でも *RECQL5/RAD54/BRCA2* の三重破壊株を用いて *BRCA2* 単独破壊株と同程度まで CDDP 感受性が回復するか検討することが望ましい。なお、*RECQL5/RAD54* 二重破壊株が薬剤未処理で致死性を示さないのは、高等真核生物においては Srs2 のオーソログが複数存在し、重複して機能しているからと考えられる(後述)。

2.3.3 RecQL5 とその他のアンチリコンビナーゼとのクロストーク

出芽酵母におけるアンチリコンビナーゼとして Srs2 が知られているが、このヘリカーゼは RecQL5 と同様に試験管内において Rad51 フィラメントを除去する活性を持ち、HR を負に制御している(Karpenshif and Bernstein 2012)。高等真核生物においては Srs2 の機能的アナログが複数報告されており、RecQL5 もその一つである。RecQL5 以外に試験管内で Rad51-ssDNA の結合を解離させる活性を持つ因子として、PARI, BLM, BRIP1/FANCD1 など報告されている(Bugreev et al. 2007; Sommers et al. 2009; Moldovan et al. 2012)。また、Rad51-mediated HR を負に制御する因子として Fbh1, RTEL1 など報告されている(Barber et al. 2008; Fugger et al. 2009)。例えば、PARI をヒト HeLa 細胞でノックダウンすると MMC に感受性となるが、DT40 細胞ではノックアウトすると CPT に感受性となる(Moldovan et al. 2012)。Fbh1 の DT40 破壊株は CPT に感受性を示すが、CDDP に対しては野生株と同程度の感受性しか示さない(Kohzaki et al. 2007)。これらの結果は DT40 細胞において CPT-induced damage は PARI と Fbh1 が、ICL-induced damage は RecQL5 が優先的にはたらく可能性を示している。さらに、アンチリコンビナーゼ単独欠損の表現型は軽度だが、二重欠損により重度の表現型を示すケースがある。線虫において *rtel-1/RTEL1* と *rcq-5/RecQL5* は合成致死となり、両者が欠損すると Rad51-foci のレベルが急激に上昇する(Barber et al. 2008)。マウス ES 細胞と DT40 細胞の両方において、BLM と RecQL5 の二重欠損は相加的な SCE の増加を示す(Wang et al. 2003; Hu et al. 2005; Otsuki et al. 2008)。これらの報告は、アンチリコンビナーゼ同士が重複してはたらいっていることを強く示唆する。今後の課題として、遺伝子の二重

and/or 三重破壊細胞を用いてアンチリコンビナーゼ間の遺伝学的相互作用を明らかにすることが重要となるだろう。その上で、DT40 細胞は非常に有効なツールとなり得るだろう。

2.3.4 RecQL5 の機能と発がんの関連

今回我々は、RecQL5 の欠損により CDDP-induced IgGC の donor usage が多様化することを明らかにした(Fig.2-19)。この結果は、RecQL5 の欠損が HR と関連した DNA 一次配列の変化を誘発することを示した初めての報告であり、RecQL5 は相同性の低い部位との組換えを抑制することで DNA 組換え修復時の正確性を保証している可能性を示唆する。分子機構の一つの可能性として、相同性の低い領域に Rad51 フィラメントが対合した場合に RecQL5 が Rad51 フィラメントを壊し、HR を抑制する可能性が考えられる。適切に対合できない Rad51 フィラメントを RecQL5 が認識し、HR による DNA 合成が進行するよりも先に除去してしまうのかもしれない。現状、RecQL5 がこの不適切な対合をどのように認識するかは不明だが、不安定な Rad51 フィラメントの構造そのものか、何らかの介在分子が認識因子として存在するのかもしれない。Ig locus においての結果なので注意して議論する必要があるものの、RecQL5 による組換えの正確性を保証する性質は *Recql5* ノックアウトマウスが高発がん性を示すことと関連があるかもしれない(Hu et al. 2007; Hu et al. 2010)。

内因性あるいは外因性の ICL 損傷が HR を誘発すると考えると、原因の一つとして内因性のアルデヒドが挙げられる。近年、マウスや DT40 細胞を用いた解析により、FA/BRCA pathway の因子がホルムアルデヒドやアセトアルデヒドの損傷耐性にはたらくことが報告された(Ridpath et al. 2007; Langevin et al. 2011; Rosado et al. 2011; Garaycochea et al. 2012)。これらのアルデヒドは細胞内においても産生され、DNA に対して ICL や DNA-Protein crosslink などの形で損傷を与えていると思われる。アルデヒドの損傷に対してアルデヒド代謝酵素(ALDH2)による解毒と FA/BRCA pathway による DNA 修復が二段構えで DNA 変異の蓄積を防いでいると考えられる。最近、日本人のファンコニ貧血患者 64 例について ALDH2 の遺伝子型との関連を調べたところ、代謝能力の低い遺伝子多型(GA ヘテロ変異、および AA ヘテロ

変異)を持つファンconi貧血患者ほど骨髄不全の発症が早いという興味深い報告がなされ(Hira et al. 2013)、FA 遺伝子と ALDH2 の強い遺伝的相互作用が示唆されている。RecQL5 もまた BRCA2 依存的 HR 修復の過程でアルデヒドダメージの修復に寄与するのかもしれない。実際に、*RECQL5*破壊株はアセトアルデヒドに高感受性となる(未発表データ)。ファンconi貧血のような全身性の常染色体劣性遺伝病の場合、仮に CRISPR/Cas9 などのゲノム改変技術により完璧な遺伝子治療が確立したとしても、理論上患者の全細胞の遺伝子を改変せねばならず、事実上不可能である。よって、根治ではなくがんなどの症状発症をできるだけ遅らせる予防的治療が次善の策であり、細胞中のアルデヒド濃度を低く保つことで、FA 欠損によるゲノム不安定化を抑制できるかもしれない。近年、ALDH2 の活性化薬として Alda-1 という薬剤が発見され、代謝能力の低い遺伝子型の ALDH2 について機能を活性化させる薬効を持つことが報告されている(Chen et al. 2008)。また、この薬剤はマウスに投与可能な濃度で薬効を示す。Alda-1 を用いた遺伝性疾患の予防的治療に向けたアプローチもまた、今後検討すべき課題である。

DT40 細胞を用いた系統的な解析により、細胞内において RecQL5 が ICL 誘導性 HR の頻度と質を制御してゲノム不安定化を抑制することを示した。*RECQL5*には対応するヒト遺伝病が存在しないが、RecQL5 の loss of function に由来する RecQ 関連症候群 (ex. ブルーム症候群)あるいはファンconi貧血様の遺伝性疾患が存在してもおかしくないだろう。一方で、プラチナ製剤の一つであるカルボプラチンに耐性化した中皮腫において、RecQL5 の発現が上昇しているとの報告もある(Roe et al. 2012)。これは、プラチナ製剤の耐性化機構に RecQL5 が ICL 修復効率の促進を通して関与する可能性を示唆し、RecQL5 の発現をダウンレギュレートすることで耐性化に対抗できるかもしれない。本研究で得られた成果は、RecQL5 および ICL 修復に関連したゲノム安定性維持機構の理解を促し、将来的には遺伝性疾患の原因解明と新規治療法の確立に向けた基盤となるだろう。

第3章 複製フォーク複合体構成因子 Tipin のカンプトテシン毒性防御機構における機能の解析

第1節 序論

3.1.1 複製フォーク複合体 -DNA 複製の必須因子と非必須因子-

真核細胞では、DNA ポリメラーゼを含む DNA 複製フォーク複合体の協調的な働きにより、正確な DNA 複製が保証されている(Branzei and Foiani 2010; Errico and Costanzo 2010)。MCM2-7 ヘテロ六量体は複製フォークの前方に位置し、Cdc45, GINS などの複製因子と相互作用して二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に開裂する働きを持つ。開裂した DNA を鋳型とし、リーディング鎖の合成を pol ϵ 、ラギング鎖の合成を pol δ および pol α がおこなう。PCNA クラップは DNA ポリメラーゼの活性を促進する。これらの因子は DNA 複製に必須の因子であり、酵母からヒトまで広く保存されている。一方、複製フォークの進行に必須ではないものの、複製フォークの効率の良い進行に関わる因子も存在する。出芽酵母における Tof1、Csm3、Mrc1(これらは分裂酵母においてそれぞれ Swi1, Swi3, Mrc1 としても知られている)は細胞の生存に必須ではないが、複製フォークの安定化への関与が示唆されている(Errico and Costanzo 2010; Leman and Noguchi 2012; Aze et al. 2013)。これらの因子は複製フォークとともに染色体上を移動し、複製障害に遭遇した複製フォークを安定に停止させ、保護する役割が報告されている。Tof1, Csm3, Mrc1 の脊椎動物細胞におけるオーソログとして Timeless (Tim), Tipin, Claspin が知られている。脊椎動物細胞におけるこれらの因子は複製チェックポイントの活性化や、姉妹染色分体の接着の確立にも寄与している(Kemp et al. 2010; Leman et al. 2010)。特に、Tim/Tof1 と Tipin/Csm3 は緊密なヘテロ複合体(fork protection complex)を形成し、Claspin/Mrc1 と一部機能を重複するものの別な役割も持つと考えられている。

3.1.2 Top1 とその阻害剤

トポイソメラーゼ I (Top1)は、MCM ヘリカーゼによる二本鎖 DNA の開裂に伴って複製フ

フォークの前方に生じるトポロジカルストレスを解消する役割を持つ(Pommier 2006; Pommier et al. 2006; Tomicic and Kaina 2013)。Top1 はねじれを解消する際に DNA 鎖のホスホジエステル結合を切断し、DNA と一時的に共有結合して Top1-cleavage complex (Top1-cc)と呼ばれる複合体を形成する。Top1-cc の形成は可逆的であり、Top1 と共有結合していない DNA 鎖の -OH 基による求核攻撃を受け、Top1 と DNA の共有結合が解消されて DNA が再結合される。よって、この際の DNA 鎖の連結は DNA リガーゼを必要としない。以上の性質より、Top1 もまた複製フォークの正常な進行に必要である。

Top1 の阻害剤の一つとしてカンプトテシン(CPT)が知られている(Pommier 2009; Tomicic and Kaina 2013)。CPT は Top1-cc に水素結合し、Top1 のクロマチンからの離脱を阻害して滞留させるとともに DNA の再結合を妨げ、DNA 複製や転写をブロックすることで細胞毒性を発揮する。CPT 存在下で生じ得る複製フォークと Top1-cc の衝突(collision)は DNA 二本鎖切断末端(DSB-end)の露出を引き起こす。CPT 誘導性 DSB は Rad51 および BRCA2 を介した HR 修復により主に修復される(Arnaudeau et al. 2000)。カンプトテシンそのものは毒性が強すぎるため、誘導体のイリノテカンが抗がん剤として使用されている。

3.1.3 *TIPIN* 遺伝子破壊株の CPT 高感受性

DNA 複製因子は細胞の増殖に関与するという重要性から、遺伝子破壊により細胞レベルでの生存は可能であっても、ノックアウトマウスは致死となる可能性が高いと考えられる。実際に、DNA 複製因子のノックアウトマウス樹立の報告はなく、脊椎動物における機能解析はもっぱら siRNA を用いたノックダウンか、あるいはアフリカツメガエル卵抽出液などを用いた試験管内の生化学的実験によるものであった。しかし、RNAi や抗体を用いた免疫除去では標的タンパク質を完全になくすことはできず、望みの表現型が得られなかったり曖昧であったりするケースが多かった。当研究室では、ノックアウトマウスの作製が困難な DNA 複製因子について脊椎動物のノックアウト細胞を樹立し網羅的な解析を行うべく、DT40 細胞を用いて DNA 複製因子の遺伝子破壊株を作製するプロジェクトが開始された。これまでに、*CLASPIN*,

SSRP1、*TIPIN*の遺伝子破壊株を樹立し、その他の株も随時作製を進めている。期待した通り、*CLASPIN* および *SSRP1* の遺伝子破壊株ではヒト細胞のノックダウン系やアフリカツメガエル卵抽出液の免疫除去系では得られなかった明確な表現型が観察された(Abe et al. 2011a; Yoshimura et al. 2011)。同様に、*TIPIN* 遺伝子破壊細胞に関しても以下のように多くの知見が得られた。

TIPIN 破壊株は生存可能ではあるものの、増殖能が著しく低下していた。増殖能低下の原因はS期進行の遅延と死細胞の増加による可能性が示唆された。次に、様々な薬剤を用いて細胞に複製ストレスを与えて感受性を評価したところ、*TIPIN* 破壊株はCPTに著しい感受性を示した(Fig.3-1)。重要なことに、*TIPIN* 破壊株におけるCPT感受性はchTipin—FLAGの発現により相補された(Fig.3-1A)。この結果は、CPT感受性は内因性のTipinの欠損によって引き起こされていることを示している。さらに、dNTP プール枯渇剤であるヒドロキシウレア(HU)、DNAポリメラーゼ阻害剤であるアフィジコリン(APH)、DNAアルキル化剤であるメチルメタンスルフォネート(MMS)には中程度の感受性を示したものの(Fig.3-1D,E,F)、CPTほど著しい感受性ではなかった(以上、当研究室修士課程修了 樋口修論より引用)。一方、トポイン

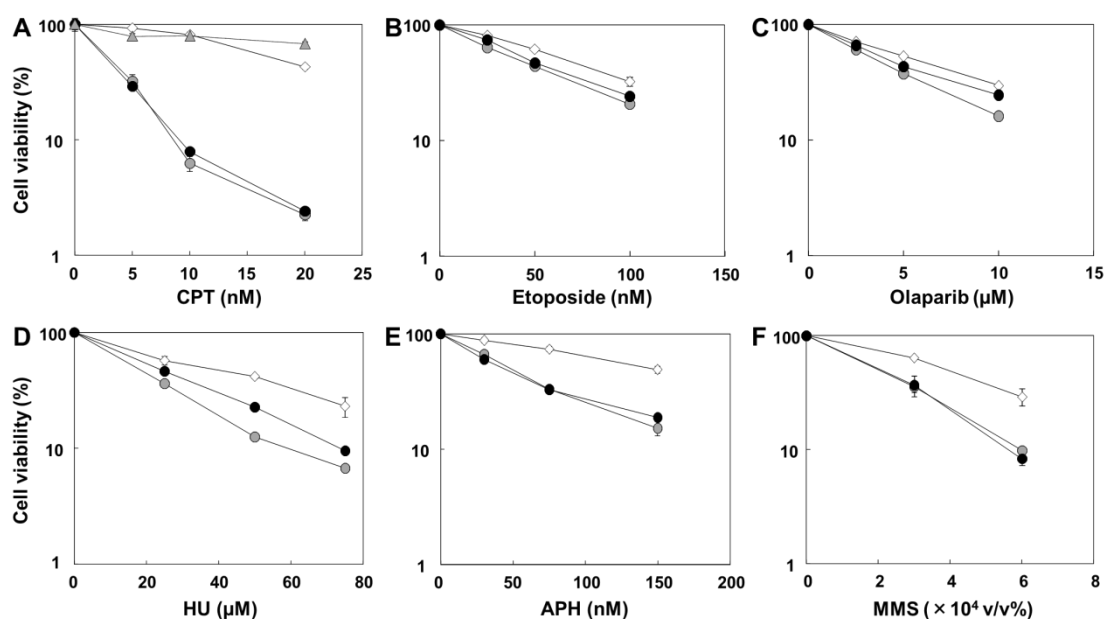


Fig. 3-1 Assessment of sensitivity to DNA replication stress-inducing agents.
Cells were incubated for 48 h in medium containing the indicated agents. Cell viability was assessed after 48 h by flow cytometry using plastic microbeads and propidium iodide (PI). Percent survival was determined by considering the number of untreated cells as 100%. The error bars indicate the standard deviation (SD) of two independent cultures.

メラゼ II (Top2)の阻害剤であるエトポシドや PARP の阻害剤であるオラパリブには明確な感受性を示さなかった(**Fig.3-1B,C**)。これらの結果は、Tipin がとりわけ CPT ダメージへの損傷耐性機構に関与する可能性を示唆している。

実際に、Tipin の結合パートナーである Timeless の出芽酵母オーソログ Tof1 は、試験管内において I 型トポイソメラーゼである Top1 との相互作用因子が報告されている(Park and Sternglanz 1999)。また、我々の研究と並行して、分裂酵母における Tipin オーソログ Swi3 の変異体が CPT に高感受性を示すという報告もなされた(Rapp et al. 2010)。しかし、高等真核生物における CPT ダメージと複製フォークの機能的関連は未だ不明な点が多い。本章では、CPT 毒性に対する細胞内防御機構において、Tipin がどのように機能するのかを解析した。

第 2 節 結果

3.2.1 CPT 処理時の DSB 末端の露出

我々は Tipin と CPT ダメージへの損傷耐性機構の関係に着目して研究を進めた。まず、CPT 処理時における H2AX のリン酸化 (γ H2AX)の検出をおこなった。 γ H2AX は複製ストレスおよび DSB の指標として知られている(Ray Chaudhuri et al. 2012)。*TIPIN* 破壊株において、薬剤無処理と CPT 存在下両方の状態で野生株よりも高いレベルの γ H2AX が検出された(**Fig.3-2A**)。厳密な評価を行うために、DSB-end の露出が増加しているかどうかを

TUNEL アッセイにより測定した。これは末端デオキリボヌクレオチド転移酵素(terminal deoxyribonucleotide transferase; TdT)の性質を利用した DNA 切断末端の定量法である。TdT は DNA 鎖の末端に dNTP を付加する活性を持つ鋳型非依存的な DNA 合成酵素である。固定

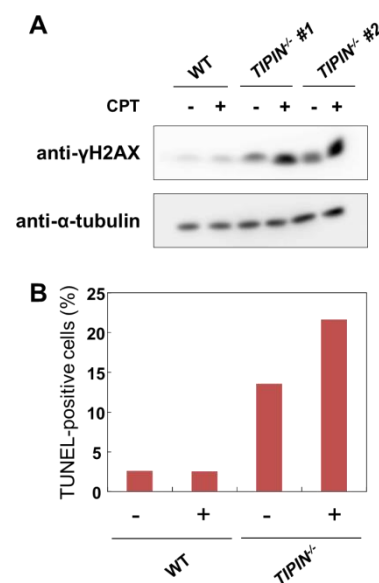


Fig. 3-2 Detection of DSB end in cells.
(A) H2AX phosphorylation (γ H2AX). Cells were treated with 40 nM camptothecin (CPT) for 4 or 8 h and analyzed by Western blotting.
(B) TUNEL assay. Cells were cultured in the presence of 50 μ M Z-VAD-fmk for 30 min, then treated with CPT for 4 h.

した細胞を TdT および Cy3 標識した dCTP でインキュベートし、フローサイトメトリーによって赤色蛍光を検出することで各サンプルの DSB-end の量を測定した。注意すべきことに、DSB-end は CPT 処理時の複製フォークと Top1-cc の衝突のみならず、細胞がアポトーシスした時も核の断片化により大量に生じ得る(第 4 章参照)。アポトーシスによる影響を除くため、細胞をカスパーゼの広域阻害剤である Z-VAD-fmk で前処理後、CPT 処理して細胞を回収した。その結果、*TIPIN* 破壊株において Z-VAD-fmk 存在下であっても CPT 処理した場合に TUNEL-positive cells の増加が観察された(**Fig.3-2B**)。なお、今回の Z-VAD-fmk の処理条件で DT40 細胞においてアポトーシスが抑制されることは以前の報告で確認している(Abe et al. 2008)。以上の結果より、CPT 処理した *TIPIN* 破壊株では、野生株よりはるかに多くの DSB-end が存在していることが示唆された。

3.2.2 CPT 処理時の DNA 損傷応答

TIPIN 破壊株において DSB-end が多量に検出される原因は、1) DSB 修復が正常にはたらかず、損傷が残存している、2) 複製フォークと Top1-cc が高頻度で衝突し、損傷が多く産生されている、という二つの可能性が考えられる。我々はまず、第一の可能性を検討した。CPT によって生じた DNA ダメージは、主に Rad51 を介する HR 修復により修復されることが知られている。*TIPIN* 破壊株において HR 経路が正常に活性化するか調べるために、Rad51 のフォーカス形成能を観察した(**Fig.3-3A**)。CPT 処理時において、*TIPIN* 欠損下でも Rad51-foci が観察された。この結果は、*TIPIN* 破壊株において HR 修復経路が正常に活性化している可能性を示唆する。

Tipin は HU、APH および紫外線処理時における複製チェックポイントの活性化に必要であると多数報告されている(Errico et al. 2007; Gotter et al. 2007; Unsal-Kacmaz et al. 2007; Yoshizawa-Sugata and Masai 2007; Kemp et al. 2010)。また、複製チェックポイントの主要因子 Chk1 の阻害剤である UCN-01 を細胞に処理すると CPT 感受性が増加するという報告もある(Sorensen et al. 2005)。*TIPIN* 破壊株の CPT 感受性の原因が Chk1 を介した複製チェッ

クポイント機構の欠損によるものか調べるために、複製チェックポイント関連因子の破壊株を用いて感受性の比較実験をおこなった。*TIPIN* 破壊株が高感受性を示す条件と比較したところ、*RAD17* および *CHK1* 破壊株のどちらもこの条件下では明確な感受性を示さなかった(Fig.3-3B)。続いて、複製チェックポイント活性化の指標である Chk1 のリン酸化を調べた。野生株および *RAD17* 破壊株では、わずかな Chk1

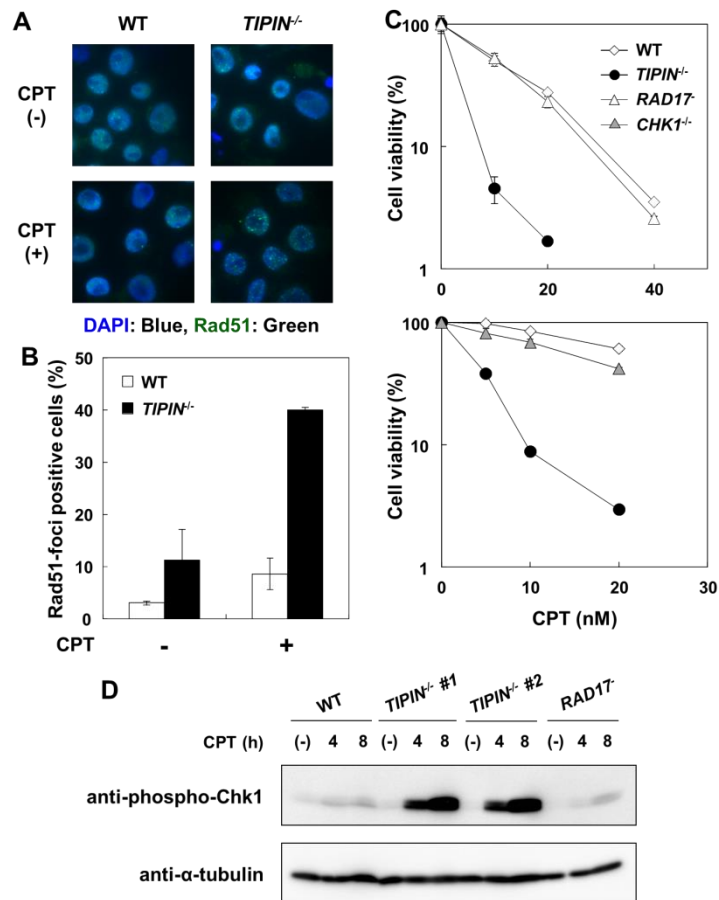


Fig. 3-3 Observation of DNA damage signals in cells.
(A,B) Rad51-foci formation. Images of cells treated or not treated with 40 nM CPT for 4 h (A) and the percentage of Rad-51 foci positive cells (B). The error bars indicate SD from two independent experiments. At least 100 nuclei were scored in each case, and nuclei containing more than four bright foci were defined as foci positive.
(C) Assessment of sensitivity. Cells were incubated for 48 h in medium containing the indicated inhibitors. Cell viability was assessed after 48 h by flow cytometry using plastic microbeads and propidium iodide (PI). Percent survival was determined by considering the number of untreated cells as 100%. The error bars indicate standard deviation (SD) of two independent cultures.
(D) Chk1 phosphorylation. Cells were treated with 40 nM CPT for 4 or 8 h and analyzed by Western blotting.

のリン酸化が検出された(Fig.3-3C)。驚くべきことに、Tipin が複製チェックポイントの活性化に関わるという報告に反して、*TIPIN* 破壊株ではむしろ Chk1 のリン酸化レベルの増強が観察された。これらの結果は、少なくとも CPT 処理時において Tipin は複製チェックポイントの活性化に必須ではなく、複製チェックポイントの欠損は今回の条件下での CPT 感受性に大きな影響を与えないようである。*TIPIN* 破壊株において CPT 処理時に Rad51-foci および Chk1 のリン酸化が高いレベルで観察されるのは、細胞内の DNA 損傷量の多寡を反映しているのかもしれない。以上をまとめると、*TIPIN* 破壊株における CPT 感受性の原因は、DSB 修復機構の機能不全とは異なる原因によるものであることが示唆された。

3.2.3 CPT 処理時の Top1 の挙動

次に、我々は複製フォークと Top1-cc が高頻度で衝突している可能性について検討した。CPT は Top1 をクロマチン上に停滞させることで機能を阻害するだけでなく、複製フォーク進行の障害物とすることで細胞毒性を発揮する薬剤である。また、複製フォークと衝突した Top1-cc は以下のようなプロセッシングを受けることが報告されている(Lin et al. 2009; Tomicic and Kaina 2013)。1) ポリユビキチン化を受け、26S プロテアソーム依存的に部分的に分解される、2) DNA 末端に残存した Top1 ペプチドは TDP1 依存的に除去される、3) リーディング鎖側が再結合されないまま露出し、DSB-end となる、4) HR 経路により露出した DSB-end が修復される。ゆえに、複製フォークと Top1-cc の衝突頻度が増えているならば、Top1 のプロテアソーム依存的分解が観察されることが考えられる。この点を検討するために、細胞成分画分を行いトータルおよびクロマチン画分の抽出液を調製し、ウェスタンブロッティングにより Top1 を検出した(Fig.3-4A)。クロマチン画分において、野生株では CPT 処理後 Top1 のクロマチン上への蓄積が観察されており、これは Top1-cc の形成を反映していると考えられる。一方、*TIPIN* 破壊株では CPT 処理時のクロマチン画分において、より低分子側に新たなバンドが出現した。この低分子側のバンドは CPT 非存在下やトータル画分においてもわずかに検出された。この結果より、CPT 処理により *TIPIN* 破壊株において Top1 のプロテアソーム依存的な分解が生じている可能性が示唆された。この点を検証するために、細胞をプロテアソームの阻害剤である MG132 とラクタシスチン(LCT)で処理した。その結果、プロテアソーム阻害剤を処理した *TIPIN* 破壊株では、CPT 処理のみの場合と比較して低分子側のバンド強度が減弱した(Fig.3-4B,C)。これは低分子側のバンドがプロテアソーム依存的な Top1 分解産物を反映している可能性を示唆し、*TIPIN* 破壊株では今回の条件下で野生株では生じない Top1 の急速な分解が起きていると考えられる。

CPT の毒性から細胞を守るために、複製フォークとその前方に生じた Top1-cc との衝突は極力回避せねばならない。複製フォークの進行を一時的に停止させれば衝突頻度を減らせると考

えられるため、*TIPIN* 破壊株における CPT 感受性が衝突頻度の増加によるものならば、複製フォークの一時停止により抑制されると期待される。よって、DNA ポリメラーゼの阻害剤である APH をあらかじめ処理したときの CPT 感受性を評価した。APH の作用は可逆的であり、洗浄して培地から取り除くことで複製フォークは進行を再開できる。期待通りに、APH 前処理により、*TIPIN* 破壊株における CPT 感受性が抑制された(**Fig.3-4D**)。さらに、APH 処理により Top1 の分解もまた抑制された(**Fig.3-4E**)。これらの結果は、複製フォークと Top1-cc の高頻度の衝突が *TIPIN* 破壊株における著しい CPT 感受性を引き起こす可能性を示唆している。

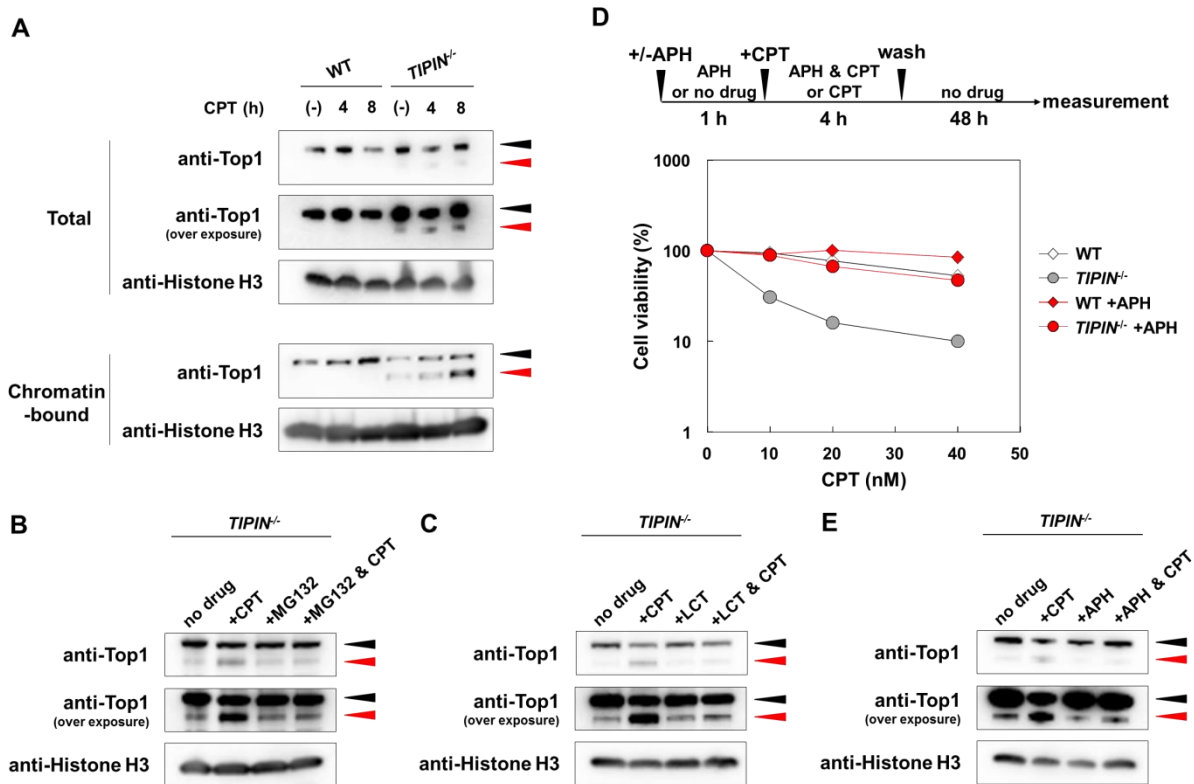


Fig. 3-4 Detection of Top1 in presence of CPT.

(A) Detection of Top1 proteins upon CPT treatment. Cells were treated with 40 nM CPT for 4 or 8 h, prepared by subcellular fractionation and analyzed by Western blotting. The black arrow indicates Top1 protein, and the red arrow indicates Top1 degradation products.

(B) Detection of Top1 proteins in the presence of CPT upon MG132 pretreatment. Cells were cultured in the presence or absence of 10 μ M MG132 for 1 h, subsequently treated with 40 nM CPT for 4 h, and then harvested and analyzed by Western blotting. Total cell lysate was applied.

(C) Detection of Top1 proteins in the presence of CPT upon lactacystin (LCT) pretreatment. Cells were cultured in the presence or absence of 5 μ M LCT for 1 h, subsequently treated with 100 nM CPT for 4 h, harvested and analyzed by Western blotting. Total cell lysate was applied.

(D) Assessment of sensitivity. Cells were cultured in the presence of 1 μ M APH for 1 h, then treated with CPT for 4 h, washed, and incubated for 48 h in drug-free medium. Cell viability was assessed after 48 h by flow cytometry using plastic microbeads and propidium iodide (PI). Percent survival was determined by considering the number of untreated cells as 100%. The error bars indicate standard deviation (SD) of two independent cultures.

(E) Detection of Top1 proteins in the presence of CPT upon APH pretreatment. Cells were cultured in the presence or absence of 5 μ M APH for 1 h, and then treated with 40 nM CPT for 4 h, harvested and analyzed by Western blotting. Total cell lysate was applied.

3.2.4 CPT 存在下における DNA 合成

CPT 存在下の *TIPIN* 破壊株では DNA 合成に影響が生じていると考えられる。この点を調べるために、チミジン類似体である BrdU を細胞に短時間取り込ませ、PI 染色との二次元解析を行い、CPT 処理時の細胞周期の進行をモニタリングした(Fig.3-5A)。この方法により、S 期を明確に区別して細胞周期を観察することができる。野生株において、CPT 処理により S 期の細胞の割合が減り、G2/M 期の細胞の割合が増加する傾向が観察された(Fig.3-5B)。一方、*TIPIN* 破壊株は薬剤無処理の状態でも S 期の細胞の割合の低下が観察されたものの、CPT 処理によりその割合は大きく変化しなかった。しかし、二次元表示した細胞周期のパターンに大きな変化が生じ、*TIPIN* 破壊株においては S 期中の BrdU 取り込み量が著しく低下していることが明らかとなった(Fig.3-5C)。これらの結果は、*TIPIN* 破壊株は CPT 処理時における S 期の進行に野生株よりも大きな異常が生じ、DNA 合成が正常に行えていない可能性を示唆する。

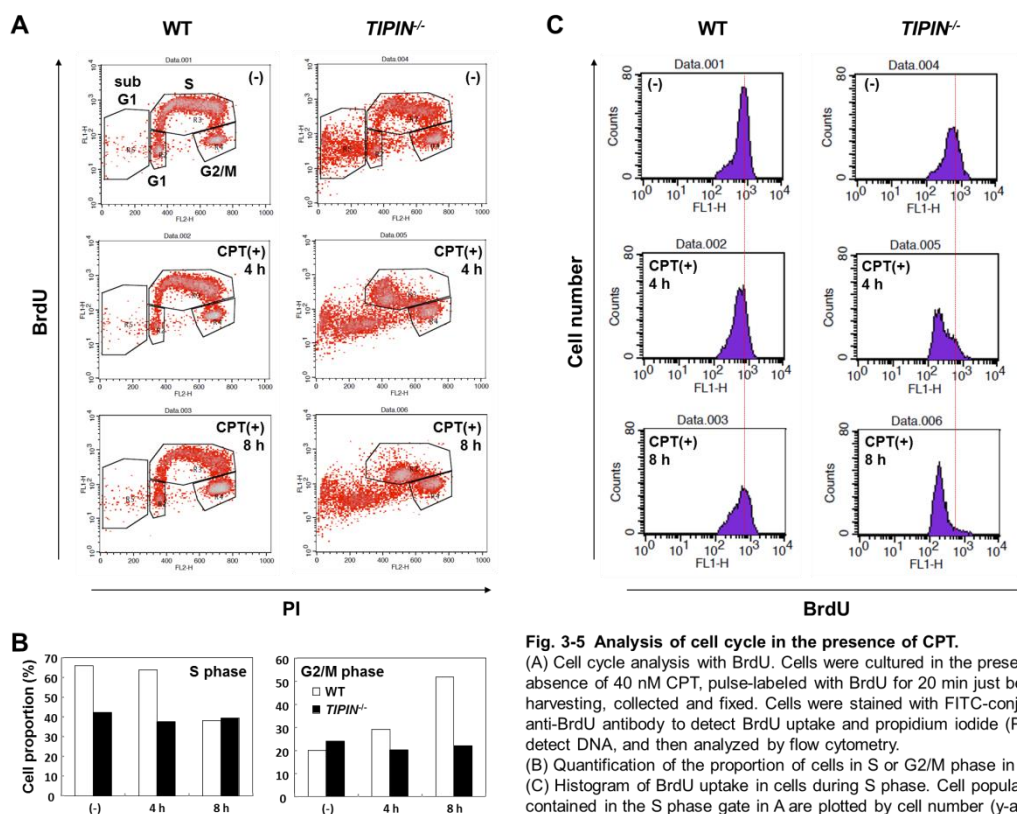


Fig. 3-5 Analysis of cell cycle in the presence of CPT. (A) Cell cycle analysis with BrdU. Cells were cultured in the presence or absence of 40 nM CPT, pulse-labeled with BrdU for 20 min just before harvesting, collected and fixed. Cells were stained with FITC-conjugated anti-BrdU antibody to detect BrdU uptake and propidium iodide (PI) to detect DNA, and then analyzed by flow cytometry. (B) Quantification of the proportion of cells in S or G2/M phase in A. (C) Histogram of BrdU uptake in cells during S phase. Cell populations contained in the S phase gate in A are plotted by cell number (y-axis) and BrdU uptake (x-axis).

3.2.5 CPT 存在下における DNA 複製フォークの進行

CPT 存在下での DNA 合成量の低下は、DNA 複製の開始頻度が低下した場合と伸長距離が低下した場合が考えられる。*TIPIN* 破壊株における DNA 複製伸長の影響を調べるために、DNA ファイバーアッセイを実施した。これは、チミジン類似体である CldU と IdU を細胞に短時間取り込ませ、ラベルされた DNA 複製領域をそれぞれに特異的な抗体で染めることで、DNA 複製フォークの進行を可視化するアッセイである

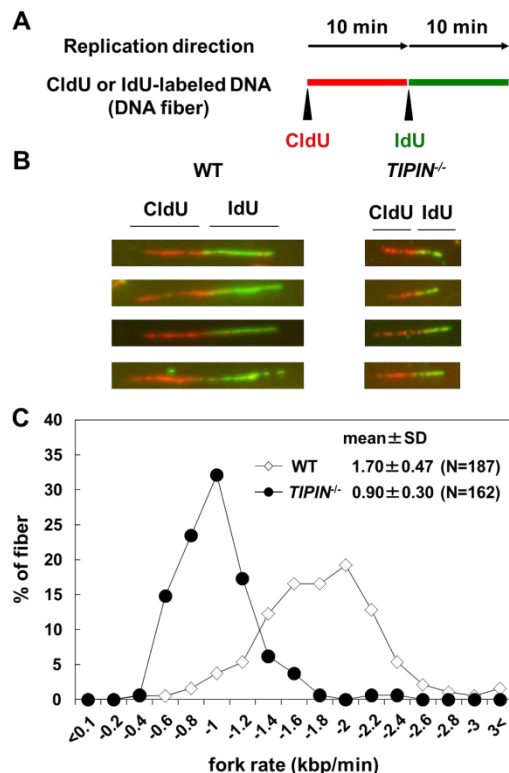


Fig. 3-6 Analysis of DNA replication elongation.
 (A) Schematic representation of the DNA fiber assay. Cells were pulse-labeled with CldU (red) and then IdU (green).
 (B) Image of typical DNA fibers.
 (C) DNA replication elongation rates as determined by the percentage of DNA fibers containing CldU. The lengths of the DNA fibers (only CldU tracks that connected with IdU tracks) prepared as shown in A were measured, and DNA replication elongation rates (fork rates) were calculated as fiber length divided by pulse-labeling time. N, number of experiments.

(Fig.3-6A)。また、進行中の複製フォークのみを計測するために二重染色を行っている。まず CldU/IdU=10 min/10 min の条件で取り込ませ、DNA 複製フォークの伸長速度(fork rate)を測定した。その結果、*TIPIN* 破壊株における DNA 複製フォークの伸長速度は、野生型のおよそ半分になることが明らかとなった(Fig.3-6B,C)。この結果は、Tipin は CPT 非存在下でも複製フォークの正常な進行の維持に必要であることを示唆している。

次に、CPT 存在下での DNA 複製伸長について解析した。CldU を取り込ませたのち、CPT 存在下で IdU を取り込ませ、CldU/IdU ratio で CPT 存在下での DNA 複製伸長の能力を評価する方法が以前に報告されている(Sugimura et al. 2008)。このとき、CPT の影響で複製伸長

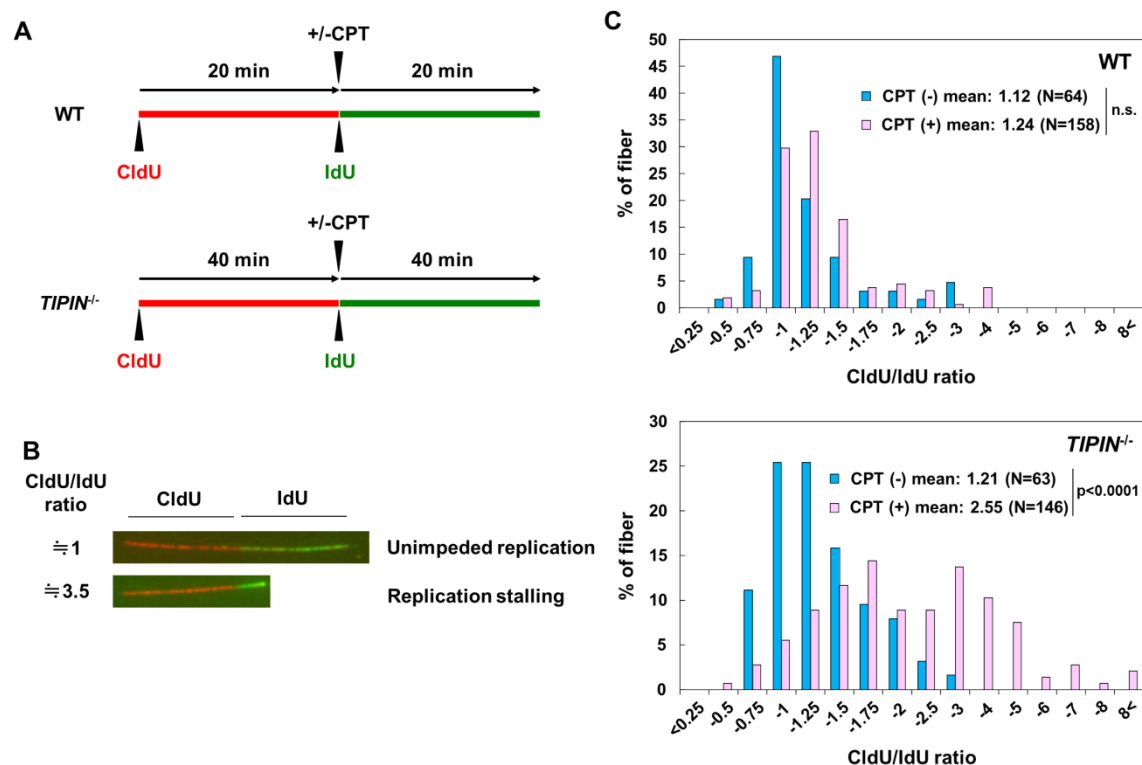


Fig. 3-7 Analysis of DNA replication elongation in the presence of CPT.

(A) Schematic representation of the DNA fiber assay in presence CPT. Cells were pulse-labeled with CldU (red) and successively pulse-labeled with IdU (green) in the presence of 100 nM CPT. To unify the encounter rate between the replication fork and the Top1 cleavage complex induced by CPT treatment, pulse-labeling time with CldU or IdU was doubled in *TIPIN*-deficient cells compared with wild-type cells. The rationale for this adjustment is described in the text.

(B) Image of typical DNA fibers following CPT treatment. Cells were pulse-labeled first with CldU (red) and then IdU (green) in the presence of CPT. Unimpeded or impeded replication-reflected DNA fibers are shown. The CldU/IdU ratio indicates the value of the CldU-labeled fiber length divided by the IdU-labeled fiber length.

(C) Distribution of the CldU/IdU ratio of replication fork progression. The lengths of the DNA fibers (only CldU tracks that connected with IdU tracks) prepared as shown in A were measured, and the CldU/IdU ratio was calculated as the CldU-labeled fiber length divided by the IdU-labeled fiber length. N, number of experiments. n.s., not significant.

能力が低下すると、CldU/IdU ratio は 1 よりも大きい数値を示すことになる(**Fig.3-7A, B**)。ここで注意すべき点として、*TIPIN* 破壊株における複製フォークの進行速度は野生株の半分程度である(**Fig.3-6C**)。IdU を野生株と *TIPIN* 破壊株で同時間取り込ませた場合、*TIPIN* 破壊株における複製フォークの進行距離は野生型の半分程度となり、Top1-cc と複製フォークが遭遇する確率(encounter rate)は *TIPIN* 破壊株の方が低くなると考えられ、CPT 処理による影響が小さくなる恐れがある。この問題を解消するために、野生株での CldU/IdU の取り込み時間を 20 min/20 min と設定したのに対し、*TIPIN* 破壊株では 40 min/40 min と設定した(**Fig.3-7A**)。興味深いことに、*TIPIN* 破壊株では野生型と比較して CPT 存在下で CldU/IdU ratio のより高値側へのシフトが観察された(**Fig.3-7C**)。慎重を期すために、我々は野生株において

CldU/IdU の取り込み時間を 40 min/40 min と設定した条件でもアッセイをおこなったが、この場合も *TIPIN* 破壊株のような高値側へのシフトは観察されなかった(**data not shown**)。以上の結果は、*TIPIN* 破壊株において CPT 存在下で DNA 複製フォークの進行距離が低下することを示している。

第 3 節 考察

TIPIN 破壊株は CPT に特に強い感受性を示したが(**Fig.3-1A**)、これは分裂酵母における Swi3 の変異株の報告と合致する。一方、Top2 阻害剤であるエトポシドにはまったく感受性を示さないため(**Fig.3-1B**)、トポイソメラーゼの中でも Top1 との関連が示唆される。また、CPT ダメージは Rad51 および BRCA2 などの Rad51 メディエーターが関与する HR により修復されるが、BRCA2 をはじめとした HR 関連因子の欠損細胞は PARP 阻害剤であるオラパリブにも強烈な感受性を示す(Qing et al. 2011; Roy et al. 2012)。しかし、*TIPIN* 破壊株はオラパリブにほとんど感受性を示さない(**Fig.3-1C**)。 *TIPIN* 破壊株において CPT-induced Rad51-foci が観察されたことと合わせても(**Fig.3-3A**)、CPT 感受性の原因は HR 修復の機能欠損ではないようである。同様に、Tim-Tipin 複合体は HU 処理時の複製チェックポイントの活性化を促進するはたらきが報告されているが(Kemp et al. 2010)、CPT 処理時の複製チェックポイントの活性化には不要であった(**Fig.3-3C**)。Tim のノックダウンにより Chk1 のリン酸化がむしろ増強したという報告もあるため(Smith et al. 2009)、Tim-Tipin 複合体は必ずしも複製チェックポイントの活性化に必要ではないのかもしれない。

一方、*TIPIN* 破壊株において CPT 処理時に Top1 の分解が観察された(**Fig.3-4**)。「Top1 の分解は複製フォークとの衝突で生じ得る」という報告を考慮すると、*TIPIN* 破壊株では野生株よりも高頻度で衝突が生じていると考えられる。CPT 処理時 *TIPIN* 破壊株において DSB-end の露出が増加すること、および DNA 複製フォークの進行距離が低下することを合わせると、CPT 感受性の原因は次のようにまとめられる(**Fig.3-8**)。1) Tipin を欠損した複製フォークは CPT 処理時に Top1-cc と高頻度で衝突し、DSB 末端を大量に産生する、2) 同時に複製フォーク

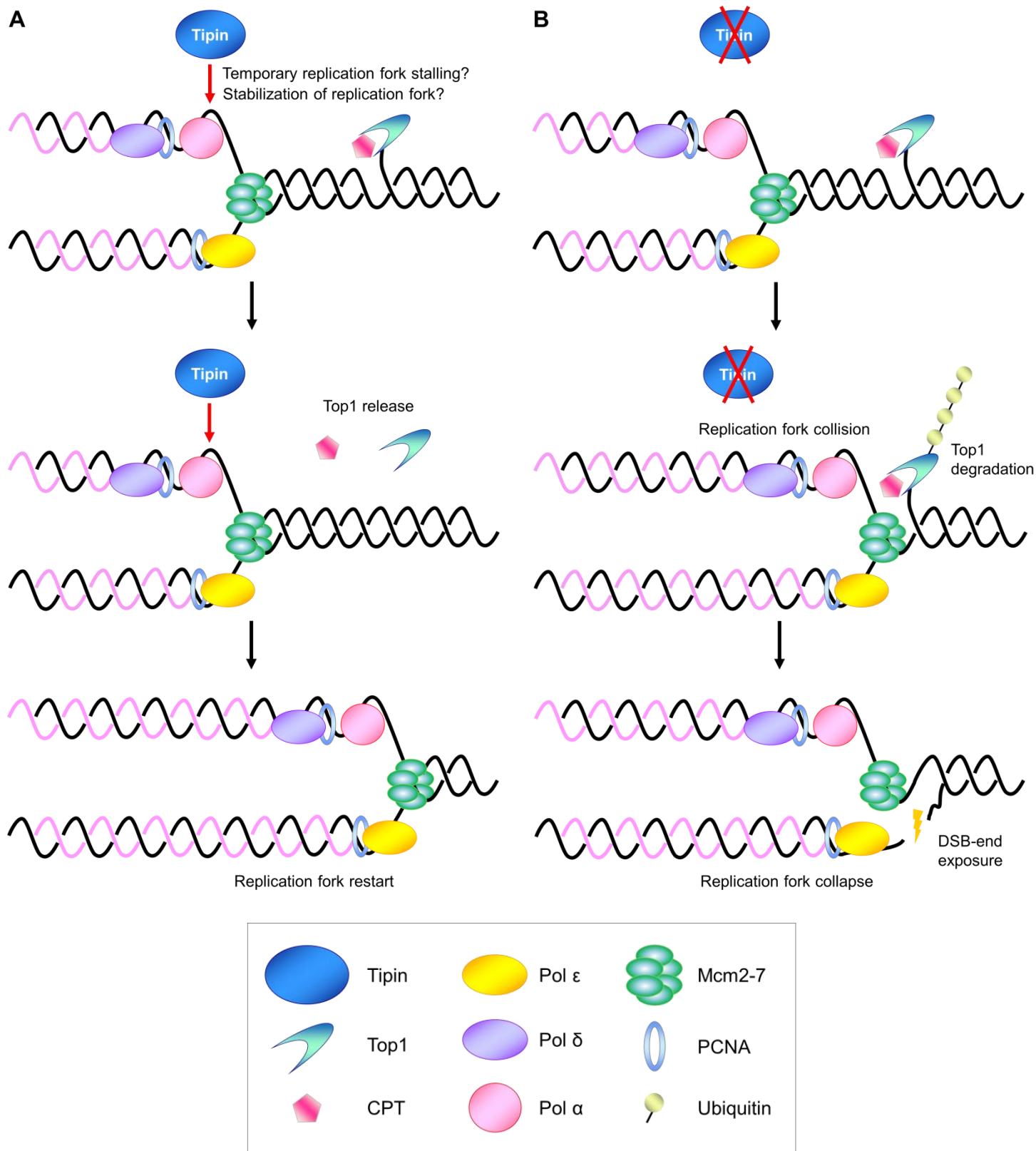


Fig. 3-8 Model of Tipin-mediated protection of the replication fork following CPT treatment.
A and B depict a model of replication fork progression in the presence of CPT in wild-type and TIPIN KO cells, respectively. The model is described in the "Discussion" section.

クの崩壊(collapse)を招くため、それ以上の DNA 複製伸長が不可能になる、3) 多量の DSB と多数の DNA 複製フォークの崩壊により細胞はゲノム安定性を維持できなくなり、アポトーシスへ向かう。したがって、Tipin には複製フォークと Top1 のクロマチン上での衝突を防ぐ機能があると考えられる。今回はその具体的な分子機構まで迫ることができなかったが、考察する上で重要な知見が酵母を用いた研究より得られている。出芽酵母において、Tim-Tipin の相同分子の欠損により、複製フォークが異常な進行を示す(Katou et al. 2003)。また、分裂酵母において、Tim-Tipin の相同分子の欠損細胞が複製ストレスを受けた時、複製フォークのリスタートができなくなる(Rapp et al. 2010)。これらの結果は、酵母における Tim-Tipin には複製フォークを一時的に進行停止させ、崩壊から保護し、再度進行を開始させる機能があることを示唆する。脊椎動物における Tim-Tipin もまた、複製フォークが複製障害と遭遇した際に、一時的に停止させ衝突から護る機能があるのかもしれない。CPT による Top1-cc の滞留は水素結合による可逆的なものであるため、CPT が遊離または不活化し Top1 がクロマチン上から離脱するか、あるいは Top1-cc が Mus81 や XPF などのエンドヌクレアーゼによって切り出され除去されれば、複製フォークの進行を再開できると考えられる。一方、TIPIN 破壊株では複製フォーク前方に Top1-cc のような障害物があっても安定な停止がおこなえず、複製フォークと Top1-cc の衝突が起こるのかもしれない。

Top1-cc と複製フォークとの衝突は CPT 非存在下であっても細胞内で起こり得る現象であり、それを回避する機構は Tipin が持つ生理的機能なのかもしれない。MMS のような本来細胞内に存在しない化学物質よりも、細胞内に元から存在し得る Top1-cc の形成を増強する CPT に TIPIN 破壊株が高感受性を示すという結果も、Tipin というタンパク質のより生理的な側面を捉えている可能性が考えられる。

Tim-Tipin 複合体には、細胞内において Tim か Tipin のどちらかを siRNA により発現抑制すると、他方のタンパク質量も減弱するという興味深い性質がある(Chou and Elledge 2006; Unsal-Kacmaz et al. 2007; Kemp et al. 2010)。これは Tim および Tipin は単量体では存在できず、Tim-Tipin 複合体として存在することで相互に安定化し合っている可能性を示唆する。

Tim と Tipin の相互作用をブロックするタンパク質-タンパク質相互作用の阻害剤は、CPT 誘導体イリノテカンなどの抗がん剤の作用を増強する新たな創薬ターゲットとして有用かもしれない。

第 4 章 SNM ヌクレアーゼのエトポシド誘導性アポトーシスへの関与の検討

第 1 節 序論

4.1.1 DNA 損傷により誘導されるアポトーシス

アポトーシス(apoptosis)は本来、形態学的な細胞死の分類の一つである。ミトコンドリア膜電位の低下、チトクロム c の放出、カスパーゼの活性化、核の凝集化と断片化などのプロセスを経て細胞が細かく断片化されて死滅する(Degterev and Yuan 2008; Vucic et al. 2011)。膨潤して破裂し炎症を引き起こす細胞死であるネクローシス(necrosis)と形態学的に区別するために提唱され、のちに一般的には、アポトーシスは「プログラムされた細胞死(programmed cell death; PCD)」を指すこととなる。おたまじゃくしの尻尾の消失にみられるアポトーシスから DNA や小胞体などに傷害を受けた細胞が起こすアポトーシスまで様々なアポトーシスが存在し、関わるタンパク質や経路はそれぞれ大きく異なる。ここでは本研究に関連の深い DNA 損傷から引き起こされるアポトーシスについて述べる。

細胞内で DNA 損傷が生じた際、チェックポイント機構が活性化して細胞周期の進行を停止させる。その間に DNA 損傷の修復が行なわれ、細胞は生存の方向に向かう。しかし、細胞の DNA 修復能を上回る多量なダメージが加わると、アポトーシス機構によって速やかに核の凝集、細胞の断片化が起こり細胞は自殺する。このような DNA 損傷により誘導されるアポトーシスにおいて中心的な役割を果たすと考えられているのが p53 である(Meulmeester and Jochemsen 2008)。p53 は通常時 MDM2 と結合し、ポリユビキチン化されてプロテアソーム依存的な分解を受けるため、細胞内では非常に低いレベルで存在している。一方、DNA 損傷により Ser15 や Ser20 がリン酸化されると MDM2 との結合が阻害され、活性化することが知られている(Vucic et al. 2011)。p53 は転写因子として CDK inhibitor である p21 の転写を誘導し、CDK2 の機能を抑制することによって S 期への進行を阻害し、細胞周期を G1 期に停止させる役割を持つ。

対して、細胞の修復能を上回る多量の損傷が加わると、p53 の Ser46 のリン酸化を介して、ミトコンドリアの膜電位が変化し、アポトーシスが誘導される(Oda et al. 2000)。また p53 は細胞膜表面に存在し、アポトーシスシグナルを伝える Fas などのデスレセプターやミトコンドリア介したアポトーシスに関わる Bcl-2 ファミリー遺伝子の発現を亢進することによりアポトーシスを誘導する(Villunger et al. 2003)。この一連の p53 によるアポトーシス誘導機能が、がん抑制遺伝子としての p53 の機能の本体であると考えられている。このように p53 を中心としたアポトーシス誘導機構の研究は発展したものの、アポトーシスのすべてが p53 に依存するわけではない。実際、p53 が機能を失った多くのがん細胞でもアポトーシスは程度の差こそあれ誘導される。これまでのアポトーシス研究では p53 やその周辺タンパク質の解析を中心として進展したが、逆に、p53 非依存的にアポトーシスを誘導する分子やそのメカニズムは現状ほとんどわかっていない。

4.1.2 DSB 誘導性アポトーシスの実行因子

当研究室では、DNA 修復因子が損傷の認識を行うと同時にアポトーシスの制御も担うという仮説を立て、DSB 修復遺伝子の破壊株を用いて各因子のアポトーシスへの関与を検討した。実験系として 100 μ M という非常に高濃度のエトポシドで各遺伝子の DT40 破壊株を短時間処理し、速やかにアポトーシスが誘導されるか否かを調べた。結果として、NHEJ に関与する DNA-PK 複合体(DNA-PKcs, KU70, KU80)および Artemis がエトポシド誘導性アポトーシスの実行に必要であることを発見し、以前に報告した(Abe et al. 2008)。また、阻害剤を用いた解析から DNA-PKcs のキナーゼ活性が重要であることも示した。エトポシドのみならずカンプトテシンや放射線などでも同様の表現型が得られることから、エトポシドに限定された機能ではなく DSB 誘導性アポトーシスにおいて広く寄与すると考えられる。のちに、ヒト Artemis が DNA-PK 依存的にアポトーシス時のクロマチンにリクルートされ、アポトーシス時の DNA の高分子量(high molecular weight; HMW)断片化に関与することが報告され(Britton et al. 2009)、我々の研究結果と合致した。しかし、NHEJ の下流ではたらく XRCC4、Lig IV、XLF

はどれもエトポシド誘導性アポトーシスにまったく関与しないため、NHEJ 因子のすべてが DNA 損傷によるアポトーシスに促進的に関与するわけではないようである。DNA ラダーとして観察が可能なヌクレオソーム単位での低分子量(low molecular weight; LMW)断片化はカスペーゼにより活性化する DNase の一種である CAD が担うが(Samejima et al. 2001)、HMW 断片化に関しては未だ不明な点も多く、実行因子も完全にはわかっていない。

4.1.3 SNM ヌクレアーゼファミリー

SNM ヌクレアーゼファミリーは、出芽酵母 SNM1/PSO2 と相同なヌクレアーゼドメイン (SNM1 ドメイン)を持つ因子群である (Yan et al. 2010)。SNM1 ドメインは metallo-beta-lactamase (MBL)ドメインと beta-CPSF-ARTEMIS-SNM1-PSO2 (β -CASP)ドメインの二つで構成されている。脊椎動物細胞では SNM1A、Apollo/SNM1B、Artemis/SNM1C、ELAC2、CPSF73 の 5 つが知られており、このうち DNA ヌクレアーゼとしてはたらくのは SNM1A-C の 3 つである。SNM1 は出芽酵母における ICL 修復への関与が示唆されているが、脊椎動物でも SNM1A および Apollo が ICL 修復へ関与することが報告されている (Ishiai et al. 2004)。Apollo はテロメアの維持における機能も知られている (Lenain et al. 2006; van Overbeek and de Lange 2006)。一方、Artemis は NHEJ に関与し、DSB 修復や V(D)J 組換えに寄与する (Ma et al. 2002)。

第 2 節 結果

4.2.1 SNM ヌクレアーゼのエトポシド誘導性アポトーシスへの関与

我々は DNA-PK および Artemis 以外のエトポシド誘導性アポトーシスの実行因子を探索した。アポトーシスにおいて Artemis は DNA-PK の下流ではたらくものの、その触媒サブユニットである DNA-PKcs と比較して Artemis を欠損した細胞の表現型は弱かった (Abe et al. 2008)。我々は、「Artemis の他に何らかの DNA ヌクレアーゼがこの経路において機能し、Artemis と協調して HMW 断片化を担うのではないか」という仮説を立てた。この候補として、

Artemis と同様のヌクレアーゼファミリーに属する DNA ヌクレアーゼである SNM1A と

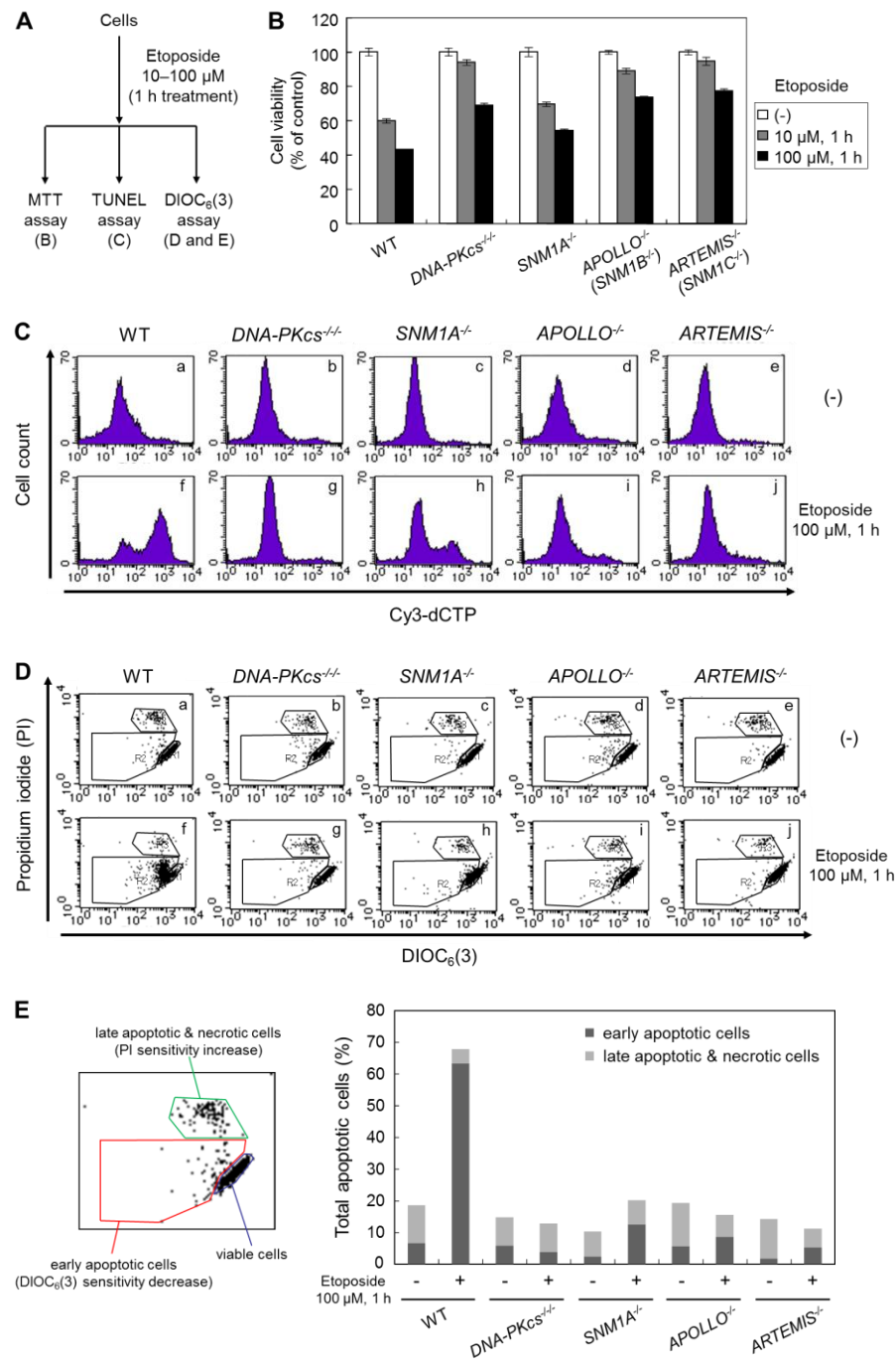


Fig. 4-1 Involvement of SNM1 family nucleases in the rapid induction of apoptosis by high doses of etoposide.

(A) Scheme for experiments shown in Figure 1 B-E.

(B) Cell viability measured by MTT assay. Cells were incubated for 1 h in the presence or absence of 10 or 100 μ M etoposide, and their viability was measured by MTT assay.

(C) Detection of DNA fragmentation by TUNEL. Etoposide-treated cells were fixed, and the termini of fragmented DNA were labeled with Cy3-dCTP. The TUNEL signal was measured by flow cytometry.

(D and E) Detection of changes in mitochondrial membrane potential with DIOC6(3). Etoposide-treated cells were mixed with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DIOC6(3)) and propidium iodide (PI) to detect changes in the mitochondrial membrane potential and to distinguish early apoptotic cells from late apoptotic and necrotic cells. Cells were analyzed by flow cytometry (D). Quantification of the data shown in Figure 1D (E).

Apollo、KU との結合が

報告されている APLF、

HR 修復の削り込み段階

で機能するヌクレアーゼ

である MRE11 について

MTT アッセイ(100 μ M,

1 h)を用いてエトポシド

誘導性アポトーシスへの関与を調べた(Fig.4-1A)。すると、SNM1A はわずかに、Apollo は

Artemis と同程度にアポトーシスへの関与が示唆された(Fig.4-1B)。DNA 断片化の有無につい

て TUNEL アッセイを用いて検出したところ、MTT アッセイの場合と同様の傾向が得られた

(Fig.4-1C)。さらに、アポトーシスの特徴であるミトコンドリアの膜電位の消失についても調

べたところ、SNM1A-C 破壊株で膜電位消失の遅延が観察された(Fig.4-1D,E)。加えて、

SNM1A および APOLLO 破壊株について、アポトーシス誘導時にカスパーゼ依存的に切断さ

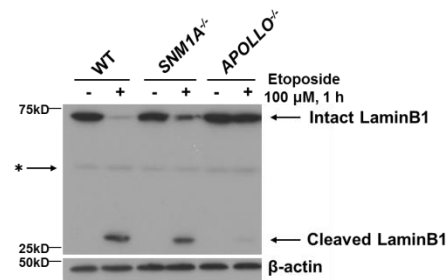


Fig. 4-2 Degradation of LaminB1 in the rapid induction of apoptosis by high doses of etoposide. To examine whether SNM1 family nucleases function upstream of caspase activation, LaminB1 degradation was measured. LaminB1 is a caspase substrate, and cleaved LaminB1 is used as an index of apoptosis. Cells incubated for 1 h in the presence or absence of 100 μ M etoposide were harvested. The asterisk indicates a non-specific band.

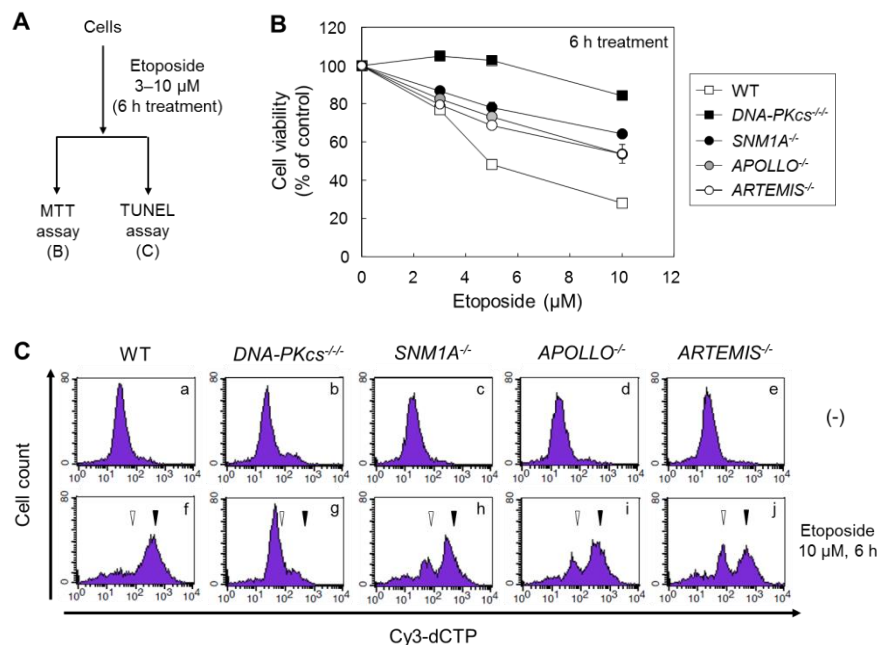


Fig. 4-3 Moderate resistance of SNM1 family nuclease mutants to etoposide-induced apoptosis. (A) Scheme for experiments shown in Figure 2 B and C. (B) Cell viability measured by MTT assay. Cells were incubated for 6 h in the presence of various concentrations of etoposide and their viability was measured by MTT assay. (C) Detection of DNA fragmentation by TUNEL. Etoposide-treated cells were fixed, and the termini of fragmented DNA were labeled with Cy3-dCTP. The TUNEL signal was measured by flow cytometry. Open arrowheads (left) and closed arrowheads (right) indicate the positions of the two peaks detected in ARTEMIS^{-/-} cells (Fig. 2C, panel j).

れることが知られている LaminB1 の挙動をウエスタンブロッティング検出したところ、両方の株において LaminB1 の分解が抑制されていた(Fig.4-2)。以上の結果は、Artemis だけでなく SNM1A、Apollo もまた、エトポシド誘導性アポトーシスにおいて機能することを示唆している。より表現型を見やすくするために、エトポシドの濃度を 10 分の 1 の 10 μ M まで下げ(Fig.4-3A)、代わりに処理を 6 時間とする条件を設定した。この条件で MTT アッセイを行うと APOLLO および ARTEMIS 破壊株においても、ある程度アポトーシスの進行が見られた(Fig.4-3B)。しかし、野生株と比較するとアポトーシス能は低下しており、一方で DNA-PKCS 破壊株はこの条件においても強いアポトーシス耐性を示した。さらに TUNEL アッセイをおこなったところ、SNM1A-C 破壊株では DNA 断片化の遅延が観察された(Fig.4-3C)。したがって、3 つの SNMヌクレアーゼは欠損によりアポトーシスにおける DNA 断片化の効率が低下する可能性が示唆された。

4.2.2 SNMヌクレアーゼ三重破壊株を用いた解析

我々は、SNMヌクレアーゼ三者が協調的に DNA 断片化に関与する可能性を考えた。各単独破壊株ではマイルドな表現型であるが三重遺伝子破壊細胞ならば、DNA-PKCS 破壊株に匹敵するアポトーシス耐性となるのではないかと期待された。京都大学放射線生物研究センターの石合博士より供与して頂いた ARTEMIS 遺伝子破壊ベクター(Ishiai et al. 2004)を SNM1A/APOLLO 二重破壊株にトランスフェクションした(Fig.4-4A)。ゲノム PCR と逆転写 PCR を用いて SNM1A/APOLLO/ARTEMIS 三重破壊株を樹立することに成功した(Fig.4-4B)。二重および三重破壊株を用いて MTT アッセイをおこなったところ、予想に反して各単独破壊株と同様にアポトーシスが誘導された(Fig.4-4C,D)。しかし、TUNEL アッセイをおこなったところ、二重および三重破壊株は DNA 断片化の相加的な遅延が観察された(Fig.4-4E)。以上の結果は、SNM1A-C のすべてがエトポシド誘導性アポトーシスにおける DNA 断片化に協調的に関与することを示唆している。

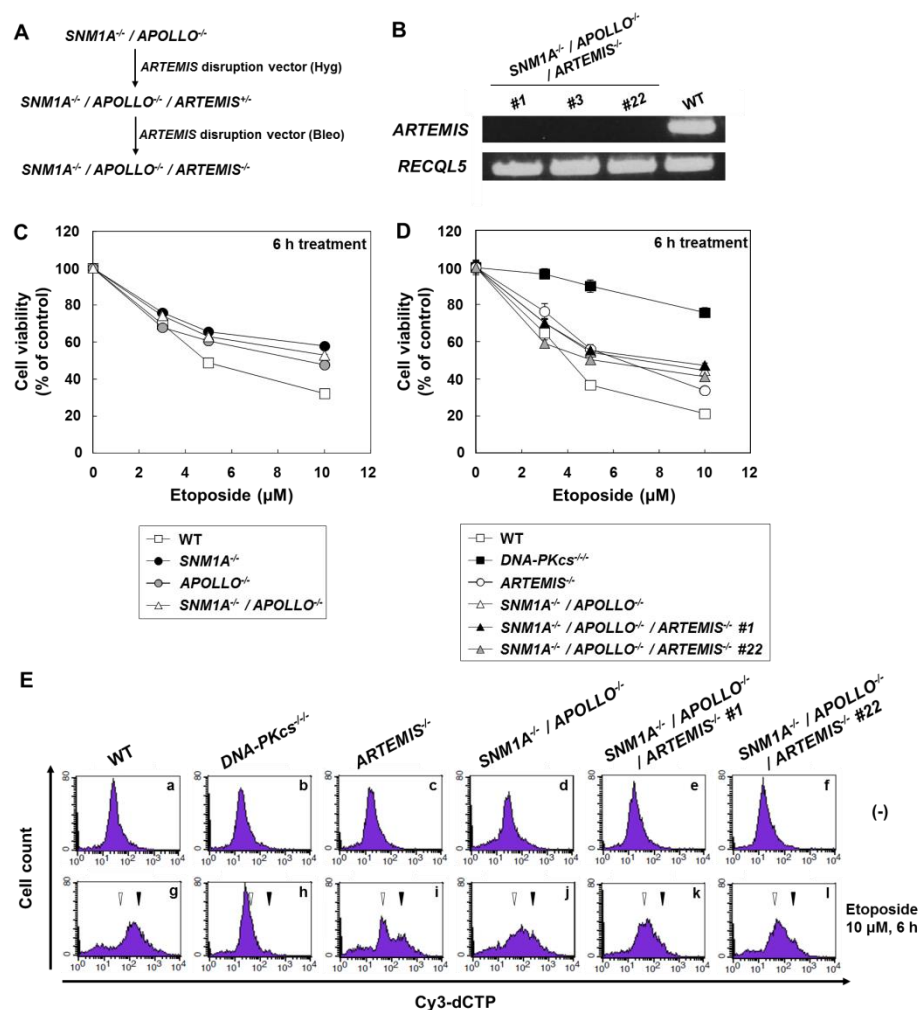


Fig. 4-4 Genetic analyses of the functional relationship of the three SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis.
 (A) Schematic representation of the generation of SNM1A^{-/-}/APOLLO^{-/-}/ARTEMIS^{-/-} triple gene knockout chicken DT40 cells.
 (B) Confirmation of the disruption of the ARTEMIS gene by RT-PCR.
 (C, D) Cell viability. Cells were incubated for 6 h in the presence or absence of 10 μM etoposide, and viability was monitored by MTT assay.
 (E) Detection of DNA fragmentation by TUNEL. The TUNEL signal was measured by flow cytometry. Open arrowheads (left) and closed arrowheads (right) indicate the positions of the two peaks detected in ARTEMIS^{-/-} cells (Fig. 3E, panel i).

第3節 考察

本研究において、我々は ICL 修復ないしテロメア維持に関与する SNM1A と Apollo が、エトポシド誘導性アポトーシスというまったく異なる経路においても機能することを初めて示した(Fig.4-5)。Artemis も含めた三重欠損はアポトーシスにおける DNA 断片化を相対的に減弱させた。しかしながら、MTT アッセイにおいては相対的なアポトーシス耐性は観察されなかった。これはアッセイ系の性質の違いによると思われる。MTT アッセイは細胞の生死を検出するわけではなく、ミトコンドリア還元酵素の活性を測定することで細胞がどの程度調子が良

いかを調べるアッセイである。ゆえに、三重破壊株では DNA 断片化の進行は遅いが、アポトーシスのシグナルそのものは伝達され細胞の調子が低下していると考えられる。ただし、同一の条件でも *DNA-PKCS* 破壊株は MTT、TUNEL とともに強いアポトーシス耐性を示すので、DNA-PK を上流としアポトーシスの誘導に関与する実行因子がまだまだ存在すると考えら

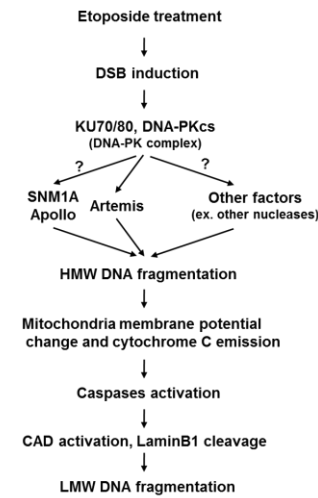


Fig. 4-5 A model for etoposide-induced apoptotic pathways

れる。実際に、DNA-PK のリン酸化基質となり得る因子は Artemis をはじめ 20 種類以上知られている。その中に SNM1A と Apollo は含まれていないが、SNM1A は DNA-PK の基質となり得る SQTQ クラスター配列を持つため、潜在的な基質である可能性は十分に考えられる。今後の検討課題として、1) SNM1A-C のヌクレアーゼ活性がアポトーシスの実行において必要か、2) アポトーシスにおけるクロマチンへの SNM1A、Apollo のリクルートは DNA-PK に依存するかどうか、3) DSB 誘導性アポトーシスに関与する他の実行因子の同定、などが挙げられる。

本研究においては NHEJ や ICL 修復といった細胞を生存させる方向に機能する因子が、細胞を死に向かわせる機能をも担う二面性を持つという意味で非常に驚きがある。また、がん化学療法においても興味深い視点を与える。近年、Top2 阻害薬と DNA-PK 阻害薬の組合せにより抗がん作用を高めるアプローチがなされている(Deriano et al. 2005; Hisatomi et al. 2011)。DSB の誘導とその修復系の一つである NHEJ 経路の阻害は一見効率的に思えるが、本研究の結果より DNA-PK の機能は修復だけではないため、アポトーシス能を阻害してしまつては逆効果である。近年、NHEJ の下流因子である Lig IV の特異的阻害薬が発見されたが(Srivastava et al. 2012)、この薬剤であればアポトーシス能を阻害することなく NHEJ 経路のみを阻害できるので、Top2 阻害薬との併用に適している。DSB 誘導性アポトーシス機構の解析は抗がん治療を考える上で新たな視点を与えるだろう。

第 5 章 本研究全体の総括

本研究は、当研究室で精力的に解析が進められてきた RecQ ヘリカーゼファミリーの一つである RecQL5 を中心に、ゲノム安定性維持に関与する種々のタンパク質の未知の機能の解明を目指して行われた。結果として、以下の 3 つの解析が特に大きく前進した。

[1] RecQL5 の DNA 鎖間クロスリンク修復における機能

RecQL5 に関して多数の遺伝子二重破壊株を用いて系統的な遺伝学的解析をおこない、RecQL5 が細胞内において、BRCA2 および Rad51 との結合に依存して ICL 修復に寄与することを初めて明らかにした。さらに、ICL 損傷誘導的な組換え反応を制御し、その頻度と正確性を適切に保つ役割があることを DT40 細胞の免疫グロブリン遺伝子座の特性を活かして明らかにすることができた。

[2] Tipin のカンプトテシン毒性防御機構における機能

CPT 毒性に対して *TIPIN* 遺伝子破壊株が高感受性を示すという当研究室での発見を進展させ、Tipin の欠損時には CPT 処理により複製フォークの進行異常が著しく引き起こされることを明らかにした。Top1 の急速な分解や DNA 複製進行距離の低下といった表現型が得られることから、Tipin 欠損時には野生株と比較して Top1 と複製フォークの高頻度の衝突が生じ、複製フォークの崩壊を誘発していると考えられる。

[3] SNM ファミリーのエトポシド誘導性アポトーシスにおける機能

SNM1A-C 単独および二重、三重遺伝子破壊株を用いて、SNM1A、Apollo、Artemis の三者が協調的に高濃度エトポシド誘導性アポトーシスに関与することを明らかにした。これは、本来 DNA 修復やテロメア維持、V(D)J 組換えといった別の機能に関わる因子がアポトーシスの誘導にも関与するという二面性を併せ持つ点が新しい。

本研究で得られた成果は、ゲノム安定性維持機構のさらなる理解を促し、基礎から臨床へと発展させていくための基盤となると考えられる。創薬へ向けたアプローチも含め、ヒト細胞等を用いた解析へと進展させていくことが今後の課題である。

第 6 章 実験材料および方法

第 1 節 細胞培養（使用株一覧）

6.1.1 使用株一覧

本研究で使用した DT40 細胞株を以下に示した。DT40 細胞は RPMI 培地を用いて、CO₂ インキュベーター内で 5% CO₂、39℃の条件で培養した。

Genotypes	Selective markers	References
CL18 (DT40 sIgM ⁻ cell)	-	(Buerstedde and Takeda 1991)
<i>RECQL5</i> ^{-/-}	Bleo, Eco	This study
<i>RECQL5</i> ^{-/-} + <i>hRECQL5-WT</i>	Puro, Eco / Bleo	This study
<i>RECQL5</i> ^{-/-} + <i>hRECQL5-T668A</i>	Puro, Eco / Bleo	This study
<i>RAD17</i> ^{-/-}	Puro	(Kobayashi et al. 2004)
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>RAD17</i> ^{-/-}	Bleo, Eco / Puro	This study
<i>FANCC</i> ^{-/-}	Bsr	(Hirano et al. 2005)
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>FANCC</i> ^{-/-}	Bleo, Eco / Puro	This study
<i>BRCA2</i> ^{+/+} (con.)	Puro, Bsr / Hyg	(Qing et al. 2011)
<i>BRCA2</i> ^{-/-}	Hyg	(Qing et al. 2011)
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>BRCA2</i> ^{+/+} (con.)	His, Eco / Puro, Bsr / Hyg	This study
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>BRCA2</i> ^{-/-}	His, Eco / Hyg	This study
<i>RAD54</i> ^{-/-} + <i>hRAD54</i>	His, Neo / Hyg	(Morrison et al. 2000)
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>RAD54</i> ^{-/-} + <i>hRAD54</i>	Bsr, Puro / His, Neo / Hyg	This study
<i>RECQL5</i> ^{-/-} / <i>AID</i> ^{-/-}	Bleo, Eco / Bsr, Puro	This study
<i>TIPIN</i> ^{-/-}	Puro, Bsr	This study
<i>TIPIN</i> ^{-/-} + <i>chTIPIN</i>	Puro, Bsr / Hyg	This study
<i>TIPIN</i> ^{-/-} / <i>RAD17</i> ^{-/-} + <i>chTIPIN</i>	Puro, Bsr / <u>Eco</u> / Hyg	This study

<i>CHK1</i> ^{-/-}	Neo, Puro	(Zachos et al. 2003)
<i>DNA-PKcs</i> ^{-/-}	His, Hyg, Neo	(Fukushima et al. 2001)
<i>SNM1A</i> ^{-/-}	Bsr, His	(Ishiai et al. 2004)
<i>APOLLO</i> ^{-/-}	Bsr, His	(Ishiai et al. 2004)
<i>ARTEMIS</i> ^{-/-}	Bsr, His	(Ishiai et al. 2004)
<i>SNM1A</i> ^{-/-} / <i>APOLLO</i> ^{-/-}	Neo, Puro / Bsr, His	(Ishiai et al. 2004)
<i>SNM1A</i> ^{-/-} / <i>APOLLO</i> ^{-/-} / <i>ARTEMIS</i> ^{-/-}	Neo, Puro / Bsr, His / Bleo, Hyg	This study

Bleo, bleomycin; Eco, ecogpt; Puro, puromycin; Bsr, blasticidin; His, histidinol; Neo, neomycin; Hyg, hygromycin.

6.1.2 培地および試薬

1) RPMI 培地

RPMI1640 培地 (日水製薬) 10.2 g、HEPES (Sigma) 2.4 g、ピルビン酸ナトリウム (WAKO) 0.1 g を脱イオン水 1 L に溶解し、高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) して 4°C で保存した。使用時には 10% NaHCO₃ で pH 7.2 になるように調整し(RPMI 培地:10% NaHCO₃ = 500 mL : 10 mL)、さらに最終濃度 2 mM L(+)-グルタミン、非働化済み 10% 牛胎仔血清、非働化済み 1% ニワトリ血清、10 μM 2-メルカプトエタノール、0.1 g/L 硫酸カナマイシン(明治製菓ファルマ) となるようにそれぞれ添加し、転倒混和して 4°C 保存した。

2) 10% NaHCO₃

NaHCO₃ 10 g を MilliQ 水 100 mL に懸濁し、密封したまま高圧蒸気滅菌した。

3) L(+)-グルタミン

1.46 g の L(+)-グルタミン(Sigma)を 0.9% saline 50 mL に溶かし、濾過滅菌した。

4) 牛胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS または fetal calf serum; FCS)

Flow 社製または Bioserum 社製のものを 56°C で 30 分非働化した後、100X Antibiotic-Antimycotic (Gibco)を 1X になるように添加し、分注して 4°C に保存した。

5) ニワトリ血清 (chicken serum ; CS)

Sigma 社製のものを 56℃で 30 分非働化した後、100X Antibiotic-Antimycotic (Gibco)を 1X になるように添加し、分注して 4℃に保存した。

6) phosphate-buffered saline ; PBS

NaCl 8.0 g、CaCl₂ 0.2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g、KH₂PO₄ 0.2 g を脱イオン水 1 L に溶解した。

7) メチルセルロース培地

216 mL MilliQ 水と 7.5 g メチルセルロース(Fluka)をそれぞれ 500 mL メディウム瓶に入れ、高圧蒸気滅菌した。熱いうちに(65～75℃くらい)、MilliQ 水をメチルセルロースの入った瓶に加え素早く良く攪拌した。2×DMEM/F-12 培地(下記(8))を 216 mL 加え、低温室で一晩攪拌した。翌日 75 mL 非働化済み FBS と 7.5 mL 非働化済み CS を加え、低温室で一晩攪拌し、4℃で保存した。

8) 2×DMEM/F-12 培地

1 L ぶんの DMEM/F-12(Gibco)および NaHCO₃(WAKO) 1.2 g を 500 mL の脱イオン水に溶解し、濾過滅菌した後、4℃で保存した。

第 2 節 遺伝子破壊株および発現株の作製 (使用薬剤一覧)

6.2.1 使用薬剤一覧

遺伝子破壊または発現細胞のセレクションに使用した薬剤を以下に示した。

<u>選択マーカー</u>	<u>使用薬剤銘柄</u>	<u>ストック濃度</u>	<u>希釈倍率</u>
Puro	Puromycin (Sigma)	0.5 mg/mL in MilliQ 水	×1000
Bsr	Blasticidin S (フナコシ)	3.0 mg/mL in saline	×100
His	L-Histidinol (Sigma)	100 mg/mL in MilliQ 水	×100
Bleo	Zeocin solution (Invitrogen)	100 mg/mL	×100
Neo	Geneticin disulfate (WAKO)	200 mg/mL in MilliQ 水	×100
Hyg	Hygromycin B (WAKO)	250 mg/mL in MilliQ 水	×100

Eco Mycophenolic acid (WAKO) 10 mg/mL in DMSO ×1000

6.2.2 DT40 細胞へのトランスフェクション

RPMI 培地で培養した約 1×10^7 個の細胞を 1000 rpm、5 分、4°C で遠心して回収後、PBS 10 mL で細胞を洗浄した。続いて、あらかじめ直鎖化しておいた 30 μ g のターゲッティングベクター(pGEM-T Easy vector を基に設計)を含む PBS 500 μ L に細胞を懸濁してキュベットに移した。氷上に 10 分静置した後、Gene Pulser Xcell および PC モジュール(BioRad)を用いて、0.55 kV、25 μ F で細胞をエレクトロポレーションし、再度氷上に 10 分静置した。細胞を 20 mL RPMI 培地に移して 24 時間、39°C で培養した後、細胞を遠心回収してセクション用薬剤を含有した RPMI 培地 40 あるいは 80 mL に再懸濁し、96 well plate に 100 μ L/well あるいは 160 μ L/well となるように播いた。5~7 日程度 39°C で培養し、生じた薬剤耐性コロニーを 24 well plate に移して培養した。ゲノム PCR、RT-PCR、ウエスタンブロッティングなどの手法を用いて遺伝子の破壊ないし発現をチェックし、株を樹立した。

6.2.3 RT-PCR

1×10^6 個の細胞を 1 mL TRIzol (Invitrogen) に溶解し、total RNA を回収した。Total RNA 800 ng を、ReverTra Ace (Toyobo) を用いて逆転写し、cDNA を得た。Primestar HS DNA polymerase in GC buffer (TaKaRa) を用いて cDNA を鋳型とした PCR を行い、遺伝子破壊の有無を確認した。PCR プログラムは以下の通りである。

↓ 98°C、10 sec

↓ 98°C、10 sec (a)

↓ 68°C、1 min / 1 kbp (b)

↓ (a)~(b) を 30~35 回繰り返す

↓ 12°C、forever

6.2.4 遺伝子破壊確認用プライマー一覧

逆転写して得られた cDNA に対し、以下のプライマーを用いて遺伝子破壊の有無を PCR で確認した。

Gene Target	Primers used in RT-PCR
<i>RECQL5</i>	5'-GGAAAACGCTGGGAAAGGTCTTCGGGTTTG-3' (sense)
<i>RECQL5</i>	5'-CCAGTGGTGTTCCTTCACTTCCAGTGCCTTC-3' (antisense)
<i>β-ACTIN</i>	5'-CGTGCTGTGTTCCTCATCTATCGTG-3' (sense)
<i>β-ACTIN</i>	5'-TACCTCTTTTGCTCTGGGCTTCATC-3' (antisense)
<i>FANCC</i>	5'-GGTTGGATAAAGCTATTGAGTGGGGTCAGG-3' (sense)
<i>FANCC</i>	5'-GTATCCAGCTGTTGGCCTTCAATTCCACAG-3' (antisense)
<i>RAD17</i>	5'-GAGCAGGTAACGGATTGGTTCGCCCAT-3' (sense)
<i>RAD17</i>	5'-GCGCTTCTTATATCACCTGAACAACC-3' (antisense)
<i>BRCA2</i>	5'-CTCGCTTCTCCTCATGGTATCTGCCACAAC-3' (sense)
<i>BRCA2</i>	5'-CAGCTCTTTCATCCTGCTGCTTTGCTCCAG-3' (antisense)
<i>RAD54</i>	5'-GCTTTCATCCGCAGCATTTTGTCCAAACCC-3' (sense)
<i>RAD54</i>	5'-ATGCCAGAATTGACGAAGTGCACCAGGCTG-3' (antisense)
<i>AID</i>	5'-CTCTACAATTTCAAGAACCTGCGCTGGGCC-3' (sense)
<i>AID</i>	5'-CAGAAGGATCCGTCGGAGTTTCCTGGACAG-3' (antisense)
<i>TIPIN</i>	5'-CCCACCTCCTACGTCTCCAGGAAGAGGTGA-3' (sense)
<i>TIPIN</i>	5'-AAAGCACCAGTCAGATCCCGAGCAACTGGG-3' (antisense)
<i>ARTEMIS</i>	5'- GCGAAGCTGGACCACTCT CAGTCGCTATCA -3' (sense)
<i>ARTEMIS</i>	5'- CCCAGCTAGGGATATCAGCATTAGACTCCT -3' (antisense)

第3節 フローサイトメトリーを用いた細胞数の計測

6.3.1 材料および試薬

1) マイクロビーズ液

高圧蒸気滅菌済みの PBS とマイクロビーズ(Poly bead Polystyrene micro spheres POL

07313, フナコシ)を 19 : 1 もしくは 9:1 の割合で混ぜた後、propidium iodide (PI)を最終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、よく混和して、4°Cで遮光保存した。

6.3.2 細胞増殖能の測定

1 $\times 10^5$ 個の細胞を 1 ml の RPMI 培地で培養して一日ごとに回収し、細胞浮遊液 : マイクロビーズ液 = 4 : 1 の割合になるように混合した。フローサイトメトリーを用いてマイクロビーズを一定数(500 個あるいは 1000 個)検出したときの生細胞数を計測した。Forward scatter が小さい値でなくかつ PI に染まらない細胞を生細胞の集団として検出した。

6.3.3 Liquid survival assay

細胞数をカウントし、2 $\times 10^4$ cells/mL の細胞浮遊液を 900 μL ずつ 24 well plate に播いた。30 分以上プレインキュベートしてから、100 μL の薬剤希釈液を添加して 36~48 時間インキュベートした。X-ray の場合は、あらかじめ各 dose の X-ray を照射した細胞を用いた。その後、細胞浮遊液をよく懸濁してから回収し、細胞浮遊液 : マイクロビーズ液 = 4 : 1 の割合になるように混合した。フローサイトメトリーを用いてマイクロビーズを一定数(500 個あるいは 1000 個)検出したときの生細胞数を計測した。Forward scatter が小さい値でなくかつ PI に染まらない細胞を生細胞の集団として検出した。

第 4 節 フローサイトメトリーを用いた死細胞の検出

6.4.1 PI 単染色による死細胞の検出

5 $\times 10^5$ 個の細胞を 3000 rpm、2 分で遠心し、ペレットを 1 $\mu\text{g/mL}$ PI を含む 1% BSA/PBS 400 μL に懸濁させ、室温で 15 分インキュベートした。フローサイトメトリーを用いて死細胞の割合を測定した。生細胞よりも Forward scatter 値が小さくかつ PI-positive の集団を死細胞として検出し、得られたデータを Cell Quest (Becton Dickinson)ソフトウェアで解析した。

第 5 節 フローサイトメトリーを用いた細胞周期分布の解析

6.5.1 PI 単染色による細胞周期分布の解析

5~10×10⁵ 個の細胞を 3000 rpm、2 分で遠心し、PBS で懸濁して再度遠心後、ペレットを 500 μL の 70% EtOH で再懸濁し、4℃でサンプルを保存した。3000 rpm、2 分で遠心したペレットを 400 μL の 5 μg/ml PI、100 μg/mL RNase を含む 1% BSA/PBS に懸濁させ、37℃で 30~60 分インキュベートした。最後にナイロンメッシュを通してフローサイトメトリーで測定し、得られたデータを Cell Quest (Becton Dickinson) ソフトウェアで解析した。

6.5.2 BrdU と PI の二重染色による細胞周期分布の解析

回収直前に 20 μM BrdU (BD Biosciences)で 20 分間処理した細胞を 1% BSA-PBS に懸濁し、3000 rpm で 2 分遠心した。ペレットを 500 μL の 70% EtOH で再懸濁し、4℃でサンプルを保存した。3,000 rpm で 3 分遠心したペレットを 400 μL の 0.5% triton X-100 / 2.5 N HCl へ再懸濁し、室温で 30 分放置した。3000 rpm で 2 分の遠心後、ペレットを 1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、50 倍希釈した FITC-conjugated anti-BrdU IgG (BD Biosciences)で室温、30 分インキュベートした。3000 rpm で 2 分の遠心後、ペレットを 1% BSA-PBS で 2 回洗浄し、5 μg/ml PI を含む 1% BSA/PBS に懸濁させ、室温で 1 時間インキュベートした。最後にナイロンメッシュを通してフローサイトメトリーで測定した。得られたデータを Cell Quest (Becton Dickinson) ソフトウェアで解析した。

第 6 節 ギムザ染色による染色体異常の検出

6.6.1 材料および試薬

1) 75 mM KCl (低張液)

2.87 g の KCl を MilliQ 水に溶解し、室温に保存した。

2) カレノア固定液

3 : 1 の割合で MeOH と AcOH を使用する直前に混合して用いた。

3) 0.5 M phosphate buffer (10×PB)

11.34 g の KH₂PO₄ と 59.69 g の Na₂HPO₄ · 12H₂O に適量の脱イオン水を加えた。pH 6.80 に合わせた後、500 mL にメスアップし、高圧蒸気滅菌したものを室温に保存した。

4) 3% ギムザ溶液

Giemsa's solution (MERCK) 原液を使用時に 0.05 M PB (1×PB) に希釈して用いた。

6.6.2 実験方法

4×10^5 個の細胞を 50 ng/mL MMC を含有した RPMI 培地で 16 時間培養し、最後の 2 時間 15 分は 0.1 μ g/mL デメコルシン存在下で培養した。細胞を回収して遠心し、PBS で一度洗浄した後、ペレットに 75 mM KCl を 10 mL 加えてよく懸濁させ 15 分室温で静置させた。カレノア固定液を 5 mL 加えてよく混合させ、1,000 rpm で 5 分遠心し、ペレットにまたカレノア固定液を 5 mL 以上加え、懸濁させて室温で 30 分放置した。その後、2 回 5 mL のカレノア固定液で細胞を洗浄し、最後にペレットを数滴のカレノア固定液に懸濁させた。この得られた細胞懸濁液を脱イオン水で表面を塗らしたスライドガラスに 2~3 滴滴下し、よく拡散させ、60°C で 30 分風乾したのち室温で保管した。スライドガラスを 3% ギムザ溶液で 20 分染色し、その後 MilliQ 水に 8 分浸した。アセトンとトルエンを用いて洗浄し、乾燥後、カナダバルサムで封入した。後日カバーガラスをマニキュアでシールした後、顕微鏡で観察した。

第 7 節 ウェスタンブロッティング

6.7.1 材料および試薬

1) 1×running buffer ; 9.09 g Tris、43.2 g Glycine、3 g SDS in MilliQ 水 (全量 3 L)

2) 5×sample buffer ;

125 mM Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、50% glycerol、0.5 M DTT、0.0625% Bromophenolblue

3) Hybond P membrane (Amersham Pharmacia)

4) Blotting buffer ; 80% 1×running buffer、20% MeOH

5) 5% Blocking buffer ; 1 g skim milk(WAKO) in 20 mL 0.05% Tween-PBS (使用時調製)

6) 一次抗体希釈液 ; 1% BSA、0.1% NaN₃ in 0.05% Tween-PBS

7) 二次抗体希釈液 ; 5) をそのまま使用

8) ECL Prime Kit (Amersham Pharmacia)

6.7.2 SDS-polyacrylamide gel の作製

Running gel (Separating gel)、stacking gel はともに、N,N,N,N-tetramethylenediamine (TEMED)および ammonium persulfate (APS)以外の全ての試薬を混合した後、running gel に TEMED および APS を加え速やかに流し込んだ。Running gel が固化した後、stacking gel に TEMED および APS を加え速やかに running gel に重層し、コームを挿入して固化させた。もしくは、市販されているミニプロティアン TGX ゲル (BioRad)を使用した。

6.7.3 サンプルの調製

1×10^6 個の細胞ペレットに 25~50 μL の $1 \times$ sample buffer を加えてよく攪拌した。95°C で 10 分加熱後、よくボルテックスし、スピンドウンしてサンプルとした。

6.7.4 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

作製したゲル板にサンプルを 5~15 μL アプライし、電気泳動装置 (BioRad) で一枚あたり 30 mA の定電流で泳動した。ミニプロティアン TGX ゲルの場合は 200 V の定電圧で泳動した。

6.7.5 Western blotting

SDS-PAGE により分離したタンパク質を、あらかじめメタノールによる親水化、blotting buffer による平衡化を済ませた Hybond P membrane に、ウェット式ブロット装置を用いて定電圧 30 V で一晩トランスファーした。翌日、membrane を 5% blocking buffer に浸し室温で 1 時間浸透した。PBS で洗浄した後、一次抗体希釈液で希釈した一次抗体を室温で 1 時間反応させ、0.05% Tween-PBS で 10 分ずつ 3 回洗浄した。次に、二次抗体希釈液で希釈した HRP 標識二次抗体を室温で 1 時間反応させ、0.05% Tween-PBS で 10 分ずつ 3 回洗浄した。ECL Prime Kit を用いてマニュアルに従って発色させ、LAS-4000 mini (FUJIFILM) で検出した。得られた画像を Multi Gauge ソフトウェアで解析した。

6.7.6 一次抗体一覧

anti-Rad51 (a kind gift from Dr. Hitoshi Kurumizaka, Waseda University)

anti-chicken FANCD2 (a kind gift from Dr. Minoru Takata, Kyoto University)

anti-phospho-Chk1-Ser³⁴⁵ (Cell Signaling)

anti- α -tubulin (clone DM1A; Sigma)

anti-HA (clone 3F10; Roche Applied Science)

anti-Histone H3 (ab1791; Abcam)

anti-phospho-Histone H2AX-Ser¹³⁹ (clone JBW301; Millipore)

anti-Top1 (556597; BD Biosciences)

anti-FLAG (M2; Sigma)

anti-LaminB1 (Invitrogen)

anti- β -actin (Sigma)

第 8 節 Ig diversification assay

6.8.1 材料および試薬

1) anti-sIgM・R-PE conjugated 抗体 (SouthernBiotech)

6.8.2 実験方法

1×10⁵ cells/mL に調整した細胞(バルクの場合)あるいはリクローニングした細胞(〜24 クローンの場合)を薬剤入り RPMI 培地に移し、数日〜数十日間培養した。測定時には細胞を回収して 3000 rpm、2 分で遠心し、1% BSA/PBS 300 μ L で懸濁して再度遠心した後、ペレットに anti-sIgM・R-PE conjugated 抗体含有液 30 μ L (1% BSA/PBS で 50 倍に希釈)を加えて懸濁し、氷上で遮光しつつ 20〜25 分インキュベートした。その後、1% BSA/PBS 1 mL を加えて洗浄し、ペレットに 1% BSA/PBS 400 μ L を加えて測定サンプルとした。フローサイトメトリを用いて生細胞を 10000 個測定し、sIgM+細胞の割合を Cell Quest ソフトウェアで解析した。シーケンス解析時には、MiniMACS Starting Kit および Anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotech)を用いて細胞を sIgM⁻ と+のフラクションに分離した。それぞれのフラクションから PrepMan Ultra (Applied Biosystems)を用いてゲノムを回収後、IgLC 領域を PCR で増幅し、ベクターに挿入してクローン化した。IgLC 領域のヌクレオチド配列を解析し、ど

の pseudo V 遺伝子を鋳型にしているか調べた。

第 9 節 姉妹染色分体交換 (SCE) の検出

6.9.1 材料および試薬

- 1) 75 mM KCl (低張液) (第 6 節参照)
- 2) カレノア固定液 (第 6 節参照)
- 3) 0.5 M phosphate buffer (10×PB) (第 6 節参照)
- 4) 3% ギムザ溶液 (第 6 節参照)
- 5) 2×MacIL valine solution (2×MB)

58.9 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ と citric acid $\cdot \text{H}_2\text{O}$ に適量の脱イオン水を加えた。pH 7.02 に合わせた後、500 mL にメスアップして室温で保存した。

- 6) 1 mg/mL Hoechst 33258 solution

Hoechst 33258 (WAKO) を 1 mg/mL になるように MilliQ 水に溶解し、4°C で遮光保存した。

6.9.2 実験方法

4×10^5 個の細胞を、10 μM BrdU を含む 2 mL の RPMI 培地で 2 細胞周期 (16.5 時間) 培養した。薬剤処理のものは 100 nM CDDP を最初に同時添加し、最後の 2 時間 15 分は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ コルセミド存在下で培養した。細胞を回収して遠心し、PBS で一度洗浄した後、ペレットに 75 mM KCl を 10 mL 加えてよく懸濁させ 15 分室温で静置させた。カレノア固定液を 5 mL 加えてよく混合させ、1,000 rpm で 5 分遠心し、ペレットにまたカレノア固定液を 5 mL 以上加え、懸濁させて室温で 30 分放置した。その後、2 回 5 mL のカレノア固定液で細胞を洗浄し、最後にペレットを数滴のカレノア固定液に懸濁させた。この得られた細胞懸濁液を脱イオン水で表面を塗らしたスライドガラスに 2~3 滴滴下し、よく拡散させ、60°C で 30 分風乾したのち室温で保管した。スライドガラスを 1×PB で希釈した 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33258 で遮光しながら 20 分染色し、1×MB でよくすすいだ。乾燥を防ぐため数滴の 1×MB を滴下後、カバーガラスをかぶせ、1 cm の距離からブラックライト (352 nm の紫外線) を 20 分照射した。次

にカバーガラスを外し、再び 1×MB でよくすすぎ、58℃の 2×SSC 中で、20 分保温した。1×PB でよくすすいだ後、3%ギムザ溶液で 20 分染色した。最後に milliQ 水に 8 分浸し、アセトンとトルエンを用いて洗浄し、乾燥後、カナダバルサムで封入した。後日、カバーガラスをマニキュアでシールした後、顕微鏡で観察した。

第 10 節 細胞免疫染色

6.10.1 材料および試薬

1) 4%パラホルムアルデヒド

パラホルムアルデヒドを 4%となるように MilliQ 50mL に懸濁し、1M NaOH を 2、3 滴加えた。50～60℃で溶かした後、10 mL ずつ分注して-20℃で保存した。

6.10.2 実験方法

3×10⁴ 個程度の細胞を回収し、サイトフューネルス(Thermo Scientific)および大型遠心機を用いて APS コート化スライドガラス(松浪硝子)上に張りつけた。ダコペンで細胞懸濁液の周囲をマーキング後、4%パラホルムアルデヒド 10 分処理により固定した。PBS で洗浄後、0.1% NP40-PBS 液で 10 分処理し、核膜の透過処理を。PBS で 2 回洗浄後、1% BSA-0.05% tween-20 PBS 液でブロッキングした。続いて、1% BSA-0.05% tween-20 PBS 液で 1000 倍希釈した anti-Rad51 抗体(早稲田大学 胡桃坂博士より恵与)ないし anti-FANCD2 抗体(京都大学 高田博士より恵与)で室温、1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、1% BSA-0.05% tween-20 PBS 液で 250 倍希釈した Alexa488-conjugated anti-rabbit 抗体(Invitrogen)で室温、1 時間インキュベートした。このとき、核染色試薬として DAPI も同時に混合した。PBS で 3 回洗浄後、マウンティングメディウムを滴下し、カバーガラスにより封入してサンプルとした。蛍光顕微鏡(DM5500B; Leica および BZ-9000; KEYENCE)において観察し、取り込んだ画像から foci-positive cells の割合を計測した。5 つ以上のシャープなフォーカスが核内にある細胞を positive cells とした。核の断片化が生じている細胞はアポトーシスが誘導されている細胞と判断し、割合計測時の分母には加えなかった。

第 11 節 DNA fiber assay

6.11.1 材料および試薬

1) Lysis solution

脱イオン水を用いて最終濃度が 0.5% SDS、200 mM Tris-HCl (pH7.4)、50 mM EDTA となるように混合し、室温で保存した。

2) カレノア固定液 (第 6 節参照)

6.11.2 実験方法

細胞を CldU (Sigma)、IdU (Sigma)で順次ラベルした後、遠心(3,000 rpm, 2 分)して回収し、冷 PBS 1 ml に再懸濁した。細胞浮遊液 2 μ l を APS コート化スライドガラス(松浪硝子)上に塗りつけ、風乾した。Lysis solution で細胞を可溶化し、スライドガラスを傾けることで DNA をスライドガラス上に引き伸ばし貼り付けた。コプリンジャー中でカレノア液 3 分、冷 70% EtOH 1 時間以上、MeOH 3 分の順に処理し DNA の固定を行った。PBS 洗浄後、2.5 M HCl で 30 分処理することで CldU と IdU を露出させ、0.1 M NaBorate で 3 分処理して酸を中和した。PBS 洗浄後、1% BSA-0.05% tween-20 PBS 液で 1000 倍希釈した anti-BrdU rat IgG (Abcam)、500 倍希釈した anti-BrdU mouse IgG (BD Biosciences)で室温、1 時間インキュベートした。続いて、0.05% tween-20 PBS 液で室温、3 分洗浄を 2 回行った後、1% BSA-0.05% tween-20 PBS 液で 1000 倍希釈した Cy3-conjugated anti-rat IgG (Jackson)、1000 倍希釈した Alexa488-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen) で室温、1 時間インキュベートした。その後 0.05% tween-20 PBS 液で室温、3 分洗浄を 3 回行った。最後に、スライドガラス上にマウンティングメディウム(Diagnostic BioSystems)を滴下し、カバーガラスにより封入してサンプルとした。蛍光顕微鏡(BZ-9000; KEYENCE)において取り込んだ画像を Image J ソフトウェアで解析し、得られた fiber の長さを計測した。DNA 複製フォークの進行距離は千塩基(kbp)単位で表し、変換係数 $1 \mu\text{m} \simeq 2.59 \text{ kbp}$ により算出した(Jackson and Pombo 1998)。

第 12 節 細胞成分分画

6.12.1 材料および試薬

- 1) Subcellular Protein Fractionation Kit #78840 (Thermo Scientific)

6.12.2 実験方法

5×10⁶個の細胞を回収し、PBS で洗浄した。その後、Subcellular Protein Fractionation Kit のプロトコールに従い分画し、western blotting sample buffer を添加してボルテックスした。95℃、10 分加熱後、スピンドウンしてサンプルとした。

第 13 節 MTT assay

6.13.1 材料および試薬

- 1) MTT 試薬 (Research Organics)
- 2) Lysis solution

MilliQ 水を用いて、最終濃度が 50%(v/v) N,N-ジメチルホルムアミド、20% SDS となるように混合し、室温で保存した。

6.13.2 実験方法

細胞をカウントし、2×10⁵ cells/mL で 90 μL ずつ 96 well plate に播いた。30 分のプレインキュベート後、10 μL の薬物により処理し、アッセイに応じてさらにインキュベートした。MTT 試薬を 25 μL /well ずつ加えてさらに 3 時間処理し、Lysis solution 100 μL /well を添加して overnight でインキュベートした。翌日、マイクロプレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した。実験の例数は n= 5 で行い、結果は平均値±標準誤差で示した。

第 14 節 TUNEL assay

6.14.1 材料および試薬

- 1) 1%パラホルムアルデヒド

第 10 節で作製したものを PBS で希釈して使用した。

2) TdT mix

TdT recombinant、TdT buffer、および Cy3-dCTP を 1 : 25 : 0.05 の割合で混合した。

6.14.2 実験方法

1×10^6 個の細胞を回収し、PBS で洗浄後、1%パラホルムアルデヒドで氷上 15 分、70%EtOH で 4℃、30 分以上処理して固定した。1% BSA/PBS で洗浄後、25 μ L の TdT mix に再懸濁して 37℃で 1 時間インキュベートした。1% BSA/PBS で 2 回洗浄後、RNase を含む 1% BSA/PBS に再懸濁して 37℃で 30 分インキュベートした。ナイロンメッシュ処理後、フローサイトメトリーで TUNEL-positive cells の割合を測定した。得られたデータを Cell Quest (Becton Dickinson) ソフトウェアで解析した。

第 15 節 ミトコンドリア膜電位変化の検出

6.15.1 材料および試薬

1) 3,3'-Diethyloxacarbocyanine iodide (DIOC₆(3); Sigma)

6.15.2 実験方法

5×10^5 個の細胞を回収し、室温で 1% FBS-PBS 1mL に再懸濁した。10 μ g/mL DIOC₆(3)および 2 mg/mL PI となる 20 μ L の混合液を調製し、各サンプルに添加して室温で 5 分インキュベートした。ナイロンメッシュ処理後、フローサイトメトリーで apoptotic cells の割合を測定し、得られたデータを Cell Quest (Becton Dickinson) ソフトウェアで解析した。

謝辞

本研究にあたり、御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野教授 稲田 利文 先生に謹んで感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益なる御助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野教授 倉田 祥一郎 先生、東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野准教授 吉成 浩一 先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、始終有益な御指導、御助言を頂きました東北薬科大学薬学部生化学教室教授 関 政幸 先生、武蔵野大学薬学部分子細胞生物学的研究室教授 榎本 武美先生に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御助言を頂き、多数の材料を恵与して頂きました京都大学放射線生物研究センターDNA 損傷シグナル研究分野教授 高田 穰 先生ならびに同分野准教授 石合 正道 先生、京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学教室教授 武田 俊一先生、イタリア IFOM 博士研究員 荒川 央 先生、アメリカ合衆国 NIH 教授 Weidong Wang 先生ならびに同分野博士研究員 M. Nurul Islam 博士に深く御礼申し上げます。

染色体異常の解析を行うにあたり、多大な御助力、御協力を頂きました就実大学薬学部教授 石井 裕 先生、anti-Rad51 抗体を恵与して下さいました早稲田大学大学院先進理工学研究科構造生物学的研究室教授 胡桃坂 仁志 先生に厚く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、有益かつ御親切な御助言を頂きました帝京平成大学薬学部教授 多田 周右 先生、武蔵野大学薬学部分子細胞生物学的研究室講師 吉村 明 先生、東北大学

大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野助教 鹿島 勲 先生に謹んで感謝致します。

本研究を進めるにあたり、師として有益かつ的確な御助言、御指導を頂きました阿部拓也博士、英文校正を中心に多数のご助言を頂きました岡勇人博士、ならびに先輩として多くの御指導を頂きました井上絵里博士、高田隼也氏、秋田玄武氏、東北薬科大学薬学部生化学教室の立ち上げを中心に研究・雑務の両面で多大なご協力を頂いた同教室 安保明博准教授ならびに同教室 中林悠助手、共に DT40 グループを盛り立ててくれた大沢洸司君、樋口優人君、梶井孔左君、石原亮介君、そして研究のみならず多方面に渡ってお世話になりました、同期を始めとする遺伝子制御薬学分野・生化学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、今日まで私を育てて頂き、9 年間の大学・大学院生活を支え温かく見守って下さいました、祖父母と弟、両親に心より感謝申し上げます。

平成 26 年 3 月 7 日

東北大学大学院薬学研究科 生命薬学専攻 遺伝子薬学分野 博士課程後期 3 年 細野 嘉史

引用文献

- Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, Adachi N, Koyama H, Takata M, Takeda S, Enomoto T et al. 2008. KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cellular signalling* **20**: 1978-1985.
- Abe T, Sugimura K, Hosono Y, Takami Y, Akita M, Yoshimura A, Tada S, Nakayama T, Murofushi H, Okumura K et al. 2011a. The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates. *J Biol Chem* **286**: 30504-30512.
- Abe T, Yoshimura A, Hosono Y, Tada S, Seki M, Enomoto T. 2011b. The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. Role of the N-terminal region of RECQL4 in cells. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 473-479.
- Aguilera A. 2002. The connection between transcription and genomic instability. *Embo J* **21**: 195-201.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**: 301-313.
- Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM. 2002. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* **295**: 1301-1306.
- Arnaudeau C, Tenorio Miranda E, Jenssen D, Helleday T. 2000. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* **461**: 221-228.
- Auerbach AD, Verlander PC. 1997. Disorders of DNA replication and repair. *Curr Opin Pediatr* **9**: 600-616.
- Aygun O, Svejstrup J, Liu Y. 2008. A RECQ5-RNA polymerase II association identified by

- targeted proteomic analysis of human chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8580-8584.
- Aygun O, Svejstrup JQ. 2010. RECQL5 helicase: connections to DNA recombination and RNA polymerase II transcription. *DNA Repair (Amst)* **9**: 345-353.
- Aygun O, Xu X, Liu Y, Takahashi H, Kong SE, Conaway RC, Conaway JW, Svejstrup JQ. 2009. Direct inhibition of RNA polymerase II transcription by RECQL5. *J Biol Chem* **284**: 23197-23203.
- Aze A, Zhou JC, Costa A, Costanzo V. 2013. DNA replication and homologous recombination factors: acting together to maintain genome stability. *Chromosoma* **122**: 401-413.
- Barber LJ, Youds JL, Ward JD, McIlwraith MJ, O'Neil NJ, Petalcorin MI, Martin JS, Collis SJ, Cantor SB, Auclair M et al. 2008. RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* **135**: 261-271.
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG, 2nd, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY et al. 2012. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**: 114-118.
- Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, Trujillo JP, Minguillon J, Ramirez MJ, Pujol R et al. 2013. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* **92**: 800-806.
- Branzei D, Foiani M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 297-308.
- . 2010. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 208-219.
- Britton S, Frit P, Biard D, Salles B, Calsou P. 2009. ARTEMIS nuclease facilitates apoptotic chromatin cleavage. *Cancer Res* **69**: 8120-8126.
- Buerstedde JM, Reynaud CA, Humphries EH, Olson W, Ewert DL, Weill JC. 1990. Light chain

- gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *Embo J* **9**: 921-927.
- Buerstedde JM, Takeda S. 1991. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* **67**: 179-188.
- Bugreev DV, Yu X, Egelman EH, Mazin AV. 2007. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* **21**: 3085-3094.
- Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. 2004. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* **23**: 2050-2056.
- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* **321**: 1493-1495.
- Chou DM, Elledge SJ. 2006. Tipin and Timeless form a mutually protective complex required for genotoxic stress resistance and checkpoint function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18143-18147.
- Chu G. 1997. Double strand break repair. *J Biol Chem* **272**: 24097-24100.
- Chu WK, Hickson ID. 2009. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat Rev Cancer* **9**: 644-654.
- Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**: 179-204.
- Crossan GP, Patel KJ. 2012. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *The Journal of pathology* **226**: 326-337.
- Crossan GP, van der Weyden L, Rosado IV, Langevin F, Gaillard PH, McIntyre RE, Gallagher F, Kettunen MI, Lewis DY, Brindle K et al. 2011. Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat Genet* **43**: 147-152.
- Deans AJ, West SC. 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 467-480.

- Degterev A, Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 378-390.
- Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, Yamamoto K, Karnitz LM. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* **21**: 1472-1477.
- Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, Binet JL, Ricoul M, Potocki-Veronese G, Favaudon V, Maciorowski Z, Muller C, Salles B et al. 2005. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood* **105**: 4776-4783.
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655-666.
- Errico A, Costanzo V. 2010. Differences in the DNA replication of unicellular eukaryotes and metazoans: known unknowns. *EMBO reports* **11**: 270-278.
- Errico A, Costanzo V, Hunt T. 2007. Tipin is required for stalled replication forks to resume DNA replication after removal of aphidicolin in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14929-14934.
- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 313-324.
- Finn K, Lowndes NF, Grenon M. 2012. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 1447-1473.
- Fugger K, Mistrik M, Danielsen JR, Dinant C, Falck J, Bartek J, Lukas J, Mailand N. 2009. Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *J Cell Biol* **186**: 655-663.
- Fukagawa T, Regnier V, Ikemura T. 2001. Creation and characterization of temperature-sensitive CENP-C mutants in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res* **29**:

3796-3803.

- Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E et al. 2001. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **276**: 44413-44418.
- Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ. 2012. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* **489**: 571-575.
- Garcia PL, Liu Y, Jiricny J, West SC, Janscak P. 2004. Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *Embo J* **23**: 2882-2891.
- Gotter AL, Suppa C, Emanuel BS. 2007. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol* **366**: 36-52.
- Gottipati P, Helleday T. 2009. Transcription-associated recombination in eukaryotes: link between transcription, replication and recombination. *Mutagenesis* **24**: 203-210.
- Heyer WD, Li X, Rolfmeier M, Zhang XP. 2006. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* **34**: 4115-4125.
- Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S et al. 2013. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* **122**: 3206-3209.
- Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, Yamazoe M, Seki M, Matsushita N, Ohzeki M, Yamashita YM, Arakawa H, Buerstedde JM et al. 2005. Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *Embo J* **24**: 418-427.
- Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. 2011. NK314 potentiates antitumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II{alpha} and

- DNA-dependent protein kinase. *Blood* **117**: 3575-3584.
- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKolver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B et al. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **27**: 851-857.
- Hu Y, Lu X, Barnes E, Yan M, Lou H, Luo G. 2005. Recql5 and Blm RecQ DNA helicases have nonredundant roles in suppressing crossovers. *Mol Cell Biol* **25**: 3431-3442.
- Hu Y, Lu X, Luo G. 2010. Effect of Recql5 deficiency on the intestinal tumor susceptibility of Apc(min) mice. *World J Gastroenterol* **16**: 1482-1486.
- Hu Y, Raynard S, Sehorn MG, Lu X, Bussen W, Zheng L, Stark JM, Barnes EL, Chi P, Janscak P et al. 2007. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev* **21**: 3073-3084.
- Ishiai M, Kimura M, Namikoshi K, Yamazoe M, Yamamoto K, Arakawa H, Agematsu K, Matsushita N, Takeda S, Buerstedde JM et al. 2004. DNA cross-link repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol Cell Biol* **24**: 10733-10741.
- Islam MN, Fox D, 3rd, Guo R, Enomoto T, Wang W. 2010. RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms--interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Mol Cell Biol* **30**: 2460-2472.
- Islam MN, Paquet N, Fox D, 3rd, Dray E, Zheng XF, Klein H, Sung P, Wang W. 2012. A variant of the breast cancer type 2 susceptibility protein (BRC) repeat is essential for the RECQL5 helicase to interact with RAD51 recombinase for genome stabilization. *J Biol Chem* **287**: 23808-23818.
- Jackson DA, Pombo A. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* **140**: 1285-1295.

- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8**: 483-489.
- Kanagaraj R, Huehn D, MacKellar A, Menigatti M, Zheng L, Urban V, Shevelev I, Greenleaf AL, Janscak P. 2010. RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic Acids Res* **38**: 8131-8140.
- Kanagaraj R, Saydam N, Garcia PL, Zheng L, Janscak P. 2006. Human RECQ5 β helicase promotes strand exchange on synthetic DNA structures resembling a stalled replication fork. *Nucleic Acids Res* **34**: 5217-5231.
- Karpenshif Y, Bernstein KA. 2012. From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* **11**: 781-788.
- Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing JF, Lewin SO, Carr L et al. 2013. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* **92**: 807-819.
- Kassube SA, Jinek M, Fang J, Tsutakawa S, Nogales E. 2013. Structural mimicry in transcription regulation of human RNA polymerase II by the DNA helicase RECQL5. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 892-899.
- Katou Y, Kanoh Y, Bando M, Noguchi H, Tanaka H, Ashikari T, Sugimoto K, Shirahige K. 2003. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* **424**: 1078-1083.
- Kawabe Y, Brnzei D, Hayashi T, Suzuki H, Masuko T, Onoda F, Heo SJ, Ikeda H, Shimamoto A, Furuichi Y et al. 2001. A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally. *J Biol Chem* **276**: 20364-20369.
- Kemp MG, Akan Z, Yilmaz S, Grillo M, Smith-Roe SL, Kang TH, Cordeiro-Stone M, Kaufmann

- WK, Abraham RT, Sancar A et al. 2010. Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* **285**: 16562-16571.
- Kim H, D'Andrea AD. 2012. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev* **26**: 1393-1408.
- Kim S, Humphries EH, Tjoelker L, Carlson L, Thompson CB. 1990. Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin light-chain gene in a bursal lymphoma cell line. *Mol Cell Biol* **10**: 3224-3231.
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. 2011. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet* **43**: 142-146.
- Kitao S, Ohsugi I, Ichikawa K, Goto M, Furuichi Y, Shimamoto A. 1998. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* **54**: 443-452.
- Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, Furuichi Y. 1999. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* **22**: 82-84.
- Knipscheer P, Raschle M, Smogorzewska A, Enoiu M, Ho TV, Scharer OD, Elledge SJ, Walter JC. 2009. The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **326**: 1698-1701.
- Kobayashi M, Hirano A, Kumano T, Xiang SL, Mihara K, Haseda Y, Matsui O, Shimizu H, Yamamoto K. 2004. Critical role for chicken Rad17 and Rad9 in the cellular response to DNA damage and stalled DNA replication. *Genes Cells* **9**: 291-303.
- Kohzaki M, Hatanaka A, Sonoda E, Yamazoe M, Kikuchi K, Vu Trung N, Szuts D, Sale JE, Shinagawa H, Watanabe M et al. 2007. Cooperative roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication

- fork collapse. *Mol Cell Biol* **27**: 2812-2820.
- Lambert S, Carr AM. 2013. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* **122**: 33-45.
- Langevin F, Crossan GP, Rosado IV, Arends MJ, Patel KJ. 2011. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* **475**: 53-58.
- Leman AR, Noguchi C, Lee CY, Noguchi E. 2010. Human Timeless and Tipin stabilize replication forks and facilitate sister-chromatid cohesion. *J Cell Sci* **123**: 660-670.
- Leman AR, Noguchi E. 2012. Local and global functions of Timeless and Tipin in replication fork protection. *Cell Cycle* **11**: 3945-3955.
- Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E. 2006. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Current biology : CB* **16**: 1303-1310.
- Lin CP, Ban Y, Lyu YL, Liu LF. 2009. Proteasome-dependent processing of topoisomerase I-DNA adducts into DNA double strand breaks at arrested replication forks. *J Biol Chem* **284**: 28084-28092.
- Liu S, Shiotani B, Lahiri M, Marechal A, Tse A, Leung CC, Glover JN, Yang XH, Zou L. 2011. ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. *Mol Cell* **43**: 192-202.
- Long DT, Raschle M, Joukov V, Walter JC. 2011. Mechanism of RAD51-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **333**: 84-87.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**: 781-794.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823-826.

- Maruyama S, Ohkita N, Nakayama M, Akaboshi E, Shibata T, Funakoshi E, Takeuchi K, Ito F, Kawasaki K. 2012. RecQ5 interacts with Rad51 and is involved in resistance of *Drosophila* to cisplatin treatment. *Biol Pharm Bull* **35**: 2017-2022.
- Mazin AV, Mazina OM, Bugreev DV, Rossi MJ. 2010. Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* **9**: 286-302.
- Meulmeester E, Jochemsen AG. 2008. p53: a guide to apoptosis. *Current cancer drug targets* **8**: 87-97.
- Moldovan GL, Dejsuphong D, Petalcorin MI, Hofmann K, Takeda S, Boulton SJ, D'Andrea AD. 2012. Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI. *Mol Cell* **45**: 75-86.
- Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S. 2000. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo J* **19**: 463-471.
- Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, Kakimoto T, Kanemaki M. 2009. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature methods* **6**: 917-922.
- Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. 2012. Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. *Mol Cell* **47**: 511-522.
- Nojima K, Hochegger H, Saberi A, Fukushima T, Kikuchi K, Yoshimura M, Orelli BJ, Bishop DK, Hirano S, Ohzeki M et al. 2005. Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Res* **65**: 11704-11711.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y et al. 2000. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**: 849-862.
- Otsuki M, Seki M, Inoue E, Abe T, Narita Y, Yoshimura A, Tada S, Ishii Y, Enomoto T. 2008.

- Analyses of functional interaction between RECQL1, RECQL5, and BLM which physically interact with DNA topoisomerase III α . *Biochim Biophys Acta* **1782**: 75-81.
- Otsuki M, Seki M, Inoue E, Yoshimura A, Kato G, Yamanouchi S, Kawabe Y, Tada S, Shinohara A, Komura J et al. 2007. Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J Cell Biol* **179**: 53-63.
- Park H, Sternglanz R. 1999. Identification and characterization of the genes for two topoisomerase I-interacting proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 35-41.
- Pommier Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6**: 789-802.
- . 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* **109**: 2894-2902.
- Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, Sordet O, Jobson AG, Thibaut L, Miao ZH, Seiler JA, Zhang H, Marchand C et al. 2006. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **81**: 179-229.
- Qing Y, Yamazoe M, Hirota K, Dejsuphong D, Sakai W, Yamamoto KN, Bishop DK, Wu X, Takeda S. 2011. The epistatic relationship between BRCA2 and the other RAD51 mediators in homologous recombination. *PLoS Genet* **7**: e1002148.
- Ramamoorthy M, May A, Tadokoro T, Popuri V, Seidman MM, Croteau DL, Bohr VA. 2013. The RecQ helicase RECQL5 participates in psoralen induced interstrand cross-link repair. *Carcinogenesis*.
- Rapp JB, Noguchi C, Das MM, Wong LK, Ansbach AB, Holmes AM, Arcangioli B, Noguchi E. 2010. Checkpoint-dependent and -independent roles of Swi3 in replication fork recovery and sister chromatid cohesion in fission yeast. *PloS one* **5**: e13379.
- Raschle M, Knipscheer P, Enoiu M, Angelov T, Sun J, Griffith JD, Ellenberger TE, Scharer OD,

- Walter JC. 2008. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* **134**: 969-980.
- Ray Chaudhuri A, Hashimoto Y, Herrador R, Neelsen KJ, Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, Costanzo V, Lopes M. 2012. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 417-423.
- Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, Sonoda E, Arakawa H, Buerstedde JM, Gillespie DA, Sale JE, Yamazoe M et al. 2007. Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res* **67**: 11117-11122.
- Roe OD, Szulkin A, Anderssen E, Flatberg A, Sandeck H, Amundsen T, Erlandsen SE, Dobra K, Sundstrom SH. 2012. Molecular resistance fingerprint of pemetrexed and platinum in a long-term survivor of mesothelioma. *PloS one* **7**: e40521.
- Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, Patel KJ. 2011. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1432-1434.
- Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA. 2010. Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair (Amst)* **9**: 331-344.
- Roy R, Chun J, Powell SN. 2012. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* **12**: 68-78.
- Sale JE. 2004. Immunoglobulin diversification in DT40: a model for vertebrate DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* **3**: 693-702.
- Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. 2001. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 45427-45432.
- Schwendener S, Raynard S, Paliwal S, Cheng A, Kanagaraj R, Shevelev I, Stark JM, Sung P, Janscak P. 2010. Physical interaction of RECQ5 helicase with RAD51 facilitates its

- anti-recombinase activity. *J Biol Chem* **285**: 15739-15745.
- Seki M, Yanagisawa J, Kohda T, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T. 1994. Purification of two DNA-dependent adenosinetriphosphatases having DNA helicase activity from HeLa cells and comparison of the properties of the two enzymes. *J Biochem* **115**: 523-531.
- Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF et al. 2012. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res* **72**: 1149-1156.
- Smith KD, Fu MA, Brown EJ. 2009. Tim-Tipin dysfunction creates an indispensable reliance on the ATR-Chk1 pathway for continued DNA synthesis. *J Cell Biol* **187**: 15-23.
- Sommers JA, Rawtani N, Gupta R, Bugreev DV, Mazin AV, Cantor SB, Brosh RM, Jr. 2009. FANCDJ uses its motor ATPase to destabilize protein-DNA complexes, unwind triplexes, and inhibit RAD51 strand exchange. *J Biol Chem* **284**: 7505-7517.
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S. 1998. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *Embo J* **17**: 598-608.
- Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. 1999. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* **19**: 5166-5169.
- Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T. 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature cell biology* **7**: 195-201.
- Srivastava M, Nambiar M, Sharma S, Karki SS, Goldsmith G, Hegde M, Kumar S, Pandey M, Singh RK, Ray P et al. 2012. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell* **151**: 1474-1487.
- Stoeckler C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, Oostra AB,

- Eirich K, Korthof ET, Nieuwint AW et al. 2011. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet* **43**: 138-141.
- Sugimura K, Takebayashi S, Taguchi H, Takeda S, Okumura K. 2008. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol* **183**: 1203-1212.
- Tang ES, Martin A. 2007. Immunoglobulin gene conversion: synthesizing antibody diversification and DNA repair. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1557-1571.
- Thompson CB, Humphries EH, Carlson LM, Chen CL, Neiman PE. 1987. The effect of alterations in myc gene expression on B cell development in the bursa of Fabricius. *Cell* **51**: 371-381.
- Tomicic MT, Kaina B. 2013. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1835**: 11-27.
- Tuteja N, Tuteja R. 2004. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur J Biochem* **271**: 1849-1863.
- Unsal-Kacmaz K, Chastain PD, Qu PP, Minoo P, Cordeiro-Stone M, Sancar A, Kaufmann WK. 2007. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* **27**: 3131-3142.
- van Overbeek M, de Lange T. 2006. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Current biology : CB* **16**: 1295-1302.
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**: 1036-1038.
- Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. 2011. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**:

439-452.

- Wang J, Xiao SH, Manley JL. 1998. Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev* **12**: 2222-2233.
- Wang W, Seki M, Narita Y, Nakagawa T, Yoshimura A, Otsuki M, Kawabe Y, Tada S, Yagi H, Ishii Y et al. 2003. Functional relation among RecQ family helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and sister chromatid exchange formation. *Mol Cell Biol* **23**: 3527-3535.
- Wang W, Seki M, Narita Y, Sonoda E, Takeda S, Yamada K, Masuko T, Katada T, Enomoto T. 2000. Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *Embo J* **19**: 3428-3435.
- Yan Y, Akhter S, Zhang X, Legerski R. 2010. The multifunctional SNM1 gene family: not just nucleases. *Future Oncol* **6**: 1015-1029.
- Yoshimura A, Akita M, Hosono Y, Abe T, Kobayashi M, Yamamoto K, Tada S, Seki M, Enomoto T. 2011. Functional relationship between Claspin and Rad17. *Biochem Biophys Res Commun* **414**: 298-303.
- Yoshizawa-Sugata N, Masai H. 2007. Human Tim/Timeless-interacting protein, Tipin, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* **282**: 2729-2740.
- Yu CE, Oshima J, Hisama FM, Matthews S, Trask BJ, Schellenberg GD. 1996. A YAC, P1, and cosmid contig and 17 new polymorphic markers for the Werner syndrome region at 8p12-p21. *Genomics* **35**: 431-440.
- Zachos G, Rainey MD, Gillespie DA. 2003. Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *Embo J* **22**: 713-723.
- Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M. 1996. Inducible

site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **24**:
543-548.

[その他の参考文献]

正井 久雄(監修) 細胞工学：細胞増殖とゲノム安定性維持のかなめ, DNA 複製のメカニズム
解明に迫る (2008) Vol. 27, No. 10

武田 俊一(監修) 細胞工学：癌治療・発癌・老化の鍵を握る DNA 修復経路 (2010) Vol. 29, No.
1

阿部 拓也 東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野 博士論文 (2010)

樋口 優人 東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野 修士論文 (2013)